

MAURÍCIO CHIBATA

**NICOTINA SUBCUTÂNEA E CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL
DE RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E TENSIOMÉTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2003

CHIBATA, Maurício

Nicotina subcutânea e cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo histológico e tensiométrico. - Maurício Chibata. – Curitiba, 2003.

xii 71p., 28 cm

Dissertação — (Mestrado em Clínica Cirúrgica) — Departamento de Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientador : Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos.

Co-orientador : Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshii

1. Nicotina; 2. Cicatrização de feridas; 3. Parede abdominal
4. Força Máxima; 5. Força de Ruptura; 6. Número de vasos.

II. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DE
TESE/DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno: **MAURÍCIO CHIBATA**

Título da Dissertação: **"NICOTINA SUBCUTÂNEA E
CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL
DE RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E
TENSIOMÉTRICO"**

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. Irineu Rubinstein - Conceito emitido **A** Equivalência **10**


Prof. Dr. Laerte Justino de Oliveira - Conceito emitido **A** Equivalência **10**

Prof. Dr. Renato Tambara Filho - Conceito emitido **A** Equivalência **10**

Conceito Final de Avaliação:

CONCEITO A EQUIVALÊNCIA DEZ

Curitiba, 18 de dezembro de 2003


Prof. Dr. Irineu Rubinstein


Prof. Dr. Laerte Justino de Oliveira


Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Existe um jeito melhor para tudo. Ache-o.

Thomas Edison

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Francisco e Eliane, pelo apoio e incentivo durante minha formação.

À minha avó Eloá, com amor e reconhecimento, pela dedicação e apoio.

À minha esposa Poliana, pelo incentivo e compreensão durante a
preparação e realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela confiança em mim depositada e pela forma generosa com que contribuiu com seus conhecimentos, tornando possível a realização deste projeto.

Ao PROF. DR. SÉRGIO OSSAMU IOSHII, por sua ajuda e empenho em dedicar seus conhecimentos à apreciação dos exames histológicos.

Ao PROF. DR. JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA, por seu inestimável estímulo, motivação e colaboração na execução deste trabalho.

Ao PROF. DR. JOSÉ MARCOS PARREIRA, pelo desprendimento em me ajudar, por servir de exemplo a nortear a minha vida profissional.

À PROF^a. DR^a. MÁRCIA OLANDOSKI, pela importante ajuda nos cálculos estatísticos.

Ao DR. JAMES SKINOVSKI, amigo, por sua ajuda indispensável em todas as fases deste trabalho, além de apoio pessoal e amizade sincera.

Ao DR. CARLOS RAVAZZANI, por sua valiosa e generosa assistência na realização da documentação fotográfica.

Aos acadêmicos: ALYSSON ROGÉRIO MATIOSKI E GLADYSTON ROBERTO MATIOSKI FILHO, pelo constante incentivo e empenho prático na elaboração deste trabalho.

Ao LACTEC, ao engenheiro SÉRGIO LUIZ HENKE e ao técnico SÉRGIO W. SANTOS, pela cooperação e atenção recebidas.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação ÉLSON DIAS DE FRANÇA e MARLEI BENEDITA VIEIRA RIBEIRO, pela sempre presente vontade de ajudar.

À CAPES e à Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento científico.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na efetivação deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	vii
	LISTA DE TABELAS.....	viii
	LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
	RESUMO.....	xi
	ABSTRACT.....	xii
1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBJETIVOS.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	HISTÓRIA DA NICOTINA.....	6
2.2	CICATRIZAÇÃO.....	7
2.3	CICATRIZAÇÃO E NICOTINA.....	11
2.3.1	Trabalhos Clínicos.....	12
2.3.2	Trabalhos Experimentais	17
3	MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	26
3.2	AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	26
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
3.4	ETAPAS EXPERIMENTAIS.....	27

3.4.1	Administração de Nicotina ou Solução Fisiológica Pré-Operatórias....	27
3.4.2	Preparo e Procedimento Operatório.....	28
3.4.3	Anestesia.....	28
3.4.4	Preparo da Pele e Posicionamento na Mesa Operatória.....	29
3.4.5	Procedimento Operatório.....	30
3.4.6	Pós-Operatório.....	32
3.4.7	Morte dos Animais e Aferições.....	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4	RESULTADOS	41
4.1	TRAÇÃO.....	41
4.1.1	Avaliação da Força Máxima.....	41
4.1.2	Avaliação da Força de Ruptura.....	42
4.2	NÚMERO DE VASOS.....	43
5	DISCUSSÃO	46
5.1	SOBRE O MÉTODO.....	46
5.2	SOBRE OS RESULTADOS.....	52
5.2.1	Análise da Força Máxima e Força de Ruptura	52
5.2.2	Análise do Número de Vasos.....	54
5.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUBCUTÂNEA EM REGIÃO DORSAL.....	28
FIGURA 2	DEMARCAÇÃO DA PELE PARA INCISÃO.....	29
FIGURA 3	INCISÃO DA PELE E TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO.....	30
FIGURA 4	ABERTURA DOS PLANOS APONEURÓTICO, MUSCULAR E PERITONEAL.....	31
FIGURA 5	SUTURA CONTÍNUA DO PLANO MÚSCULO-APONEURÓTICO	31
FIGURA 6	RETIRADA DA PELE, TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO E FIO DE SUTURA.....	33
FIGURA 7	PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	34
FIGURA 8	MÁQUINA DE TRAÇÃO COMPUTADORIZADA - INSTRON 4467.....	35
FIGURA 9	SEQÜÊNCIA DE RUPTURA DE UM CORPO DE PROVA.....	36
FIGURA 10	PEÇA CRANIAL (A) ENVIADA PARA MÁQUINA DE TRAÇÃO PEÇA CAUDAL (B) PARA ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.....	37
FIGURA 11	EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA (200X) CORADA PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA ILUSTRANDO VASOS SANGÜÍNEOS (SETA).....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	VALORES DA FORÇA MÁXIMA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	41
TABELA 2	VALORES DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	42
TABELA 3	NÚMERO DE VASOS	43

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	VALORES MÉDIOS DA FORÇA MÁXIMA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	42
GRÁFICO 2	VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO.....	43
GRÁFICO 3	VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE VASOS NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

g	= grama
mg	= miligrama
kg	= quilograma
l	= litro
ml	= mililitro
cm	= centímetro
kgf	= quilograma-força
mm	= milímetro
PDGF	= fator de crescimento derivado das plaquetas
FGF	= fator de crescimento de fibroblastos
VEGF	= fator de crescimento vascular endotelial
PG 12	= prostaglandina 12
bFGF	= fator de crescimento básico de fibroblastos
DNA	= ácido desoxirribonucléico
µg	= micrograma
ng	= nanograma
a.C.	= antes de Cristo
®	= marca registrada
p	= nível de significância estatística
vs.	= versus
%	= porcentagem
pO ₂	= pressão parcial de oxigênio
LACTEC	= Laboratório Central do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento
Hg	= Mercúrio
gf	= grama-força

RESUMO

NICOTINA SUBCUTÂNEA E CICATRIZAÇÃO DA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E TENSIOMÉTRICO

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da nicotina, o principal componente vasoativo do cigarro, sobre a força de ruptura e força máxima na cicatriz cirúrgica abdominal de ratos e sua possível interferência na formação de novos vasos sanguíneos. Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, divididos de maneira aleatória em dois grupos denominados grupo Nicotina (N) e grupo Controle (C). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, de acordo com o intervalo de tempo utilizado para a avaliação. No grupo N, composto por 30 animais, foi administrada nicotina subcutânea, na dose de 2mg por kg de peso do rato, diluída em 0,1ml de solução fisiológica a 0,9%, em duas aplicações diárias; a droga foi utilizada por 28 dias prévios à cirurgia, apresentando continuidade por mais 7, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo do animal e o intervalo pós-cirúrgico da aferição. No grupo C, igualmente composto por 30 animais e que serviu de controle para o estudo, foi administrada solução fisiológica a 0,9% nas mesmas condições, volume e intervalos de tempo do uso de nicotina. Após 28 dias de uso da droga ou da solução controle, foram realizadas laparotomias medianas com 6cm de extensão em todos os animais e fechamento com fio inabsorvível de forma contínua e em massa. Realizaram-se as aferições tensiométricas e histológicas no 7º, 14º e 28º dias de pós-operatório, quando foram mortos 10 ratos de cada grupo. Os retalhos foram preparados retirando-se a pele juntamente com o tecido celular subcutâneo e o fio de sutura da aponeurose. O segmento cranial foi encaminhado à análise da força de ruptura e força máxima por meio de máquina de tração computadorizada; o segmento caudal foi encaminhado para análise histopatológica, mediante técnica de imunohistoquímica para a contagem dos vasos sanguíneos. A análise estatística incluiu o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Na variável força máxima não houve diferença significativa no 7º e 28º dia pós-operatório. No 14º dia a força máxima foi significativamente menor no grupo nicotina em relação ao grupo controle ($0,900 \pm 0,2936\text{kgf}$ vs. $1,517 \pm 0,4390\text{kgf}$, $p=0,0041$). Não houve diferença significativa na variável força de ruptura. A média do número de vasos foi menor no grupo nicotina em relação ao grupo controle no 7º dia de pós-operatório ($16,84 \pm 2,8407$ vs. $25,94 \pm 3,9396$, $p=0,0001$). Não houve diferença significativa na variável número de vasos no 14º e 28º dia. Este estudo permite concluir que a nicotina associa-se à piora da cicatrização da parede abdominal de ratos apresentando, no 14º dia de pós-operatório, diminuição da força máxima, além de uma menor quantidade de vasos sanguíneos no 7º dia pós-operatório.

Palavras-chave: 1. Nicotina; 2. Cicatrização de feridas; 3. Parede abdominal; 4. Força Máxima; 5. Força de Ruptura; 6. Número de vasos .

ABSTRACT

SUBCUTANEOUS NICOTINE AND HEALING OF THE ABDOMINAL WALL IN RATS: AN HISTOLOGICAL AND TENSIOMETRIC STUDY

The aim of this study was to analyze the effect of nicotine, the main vasoactive ingredient in tobacco, on the rupture strength and maximum strength of the wound after a laparotomy in rats, and its potential effect on the formation of new blood vessels. Sixty *Wistar* rats were used, randomized in two groups: the Nicotine group (N) and the Control group (C). Each group was further divided into 3 subgroups, according to the time interval used for evaluation. In group N (n=30), nicotine was administered subcutaneously, 2mg/kg diluted in 0.1ml of 0.9% saline solution twice a day; nicotine was used for 28 days prior to surgery, and continued for 7, 14 or 28 days, depending on the subgroup and post-operative interval considered for assessment. In group C (n=30), 0.9% saline solution was administered under the same conditions, in the same volume and at time intervals as the nicotine group. After 28 days using nicotine or saline solution, 6 cm longitudinal laparotomy was performed in all rats, it was closed with non-absorbable suture, in a continuous and mass-like fashion. The tensiometric and histological tests were done at the 7th, 14th, and 28th days post-op when 10 rats in each group were killed. The specimens were prepared by removing the skin along with the subcutaneous cell tissue and the aponeurotic tissue. The cranial segment was used for rupture strength and maximum strength tests performed by a computerized traction device (*Instron 4467, London, U.k.*); the caudal segment was used for histological analysis using the immunohistochemistry technique for blood vessel count. Mann-Whitney non-parametric test was used for statistical analysis. There was no significant difference in the maximum strength variable neither on the 7th and on the 28th day post-op. On the 14th day, maximum strength was significantly lower in the nicotine group as compared to the control group ($0.900 \pm 0.2936\text{kgf}$ vs. $1.517 \pm 0.4390\text{kgf}$, $p=0.0041$). There was no significant difference in the rupture strength variable. The average number of blood vessels was smaller in the nicotine group as compared to the control group on the 7th day post-op (16.84 ± 2.8407 vs. 25.94 ± 3.9396 , $p=0.0001$). There was no significant difference for the number of vessels on the 14th and 28th days. It is concluded that nicotine is associated to poorer healing of the abdominal wall in rats, which presented a decrease in the maximum strength on the 14th post-operative day, and a smaller amount of blood vessels on the 7th post-operative day.

Key words: 1. Nicotine; Healing; Abdominal wall; Maximum strength; Rupture Strength; Blood vessels.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A parede abdominal representa a porta de entrada para a maioria dos procedimentos cirúrgicos do trato digestório e das áreas retroperitoneais. O fechamento desta cavidade é uma técnica de rotina e um dos primeiros ensinamentos ao cirurgião no início de sua carreira.

Esse procedimento pode apresentar como complicações a eventração, definida como a separação pós-operatória das camadas músculo-aponeuróticas do abdome, mantendo-se íntegra a pele; ou a evisceração, em que todas as camadas sofrem ruptura. Esse tipo de intercorrência é grave complicação do processo cicatricial das laparotomias, e diversos fatores podem estar relacionados, como o estado nutricional do doente, doenças sistêmicas e a técnica cirúrgica empregada (ORGILL e DEMLING, 1988; SEID, OWENS, POOLE e MEEKS, 1995).

Sabe-se que a incidência de eventrações continua ainda relativamente inalterada, segundo a revisão de POOLE (1985). A análise recente de CARLSON (1997) apresenta uma incidência de 1,2% de hérnias incisionais, não demonstrando tendência decrescente em relação às revisões anteriores.

A associação entre a dificuldade de cicatrização das feridas e diversos fatores como obesidade, diabetes, insuficiência renal, icterícia, anemia, desnutrição, neoplasias, infecções, corticosteróides e outros fatores como o fumo, tem sido observada com frequência na prática clínica (CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984; RIEBEL, BODEN, WHITESIDES e HUTTON, 1995).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, morreram no ano de 1990, em todo o mundo, cerca de 2,5 milhões de pessoas como consequência do hábito de fumar. Nos próximos 25 anos, 500 milhões de pessoas deverão morrer, sendo que 70% destas mortes ocorrerão nos países subdesenvolvidos. O tabaco é a droga mais comumente utilizada e amplamente disseminada no mundo atual, e seu uso é legal em todos os países, mesmo sendo letal (GADELHA, 1990).

Em seu estudo sobre a epidemiologia do tabaco, HIJJAR e COSTA E SILVA (1991) relataram que no Brasil cerca de 25% da população é de fumantes, devendo morrer anualmente de 80 a 100 mil pessoas em decorrência das doenças tabaco-relacionadas.

A fumaça do cigarro contém mais de 4 mil componentes, mas os principais efeitos tóxicos do tabaco são atribuídos à presença de monóxido de carbono, óxido nítrico, amoníaco e nicotina (REUS, ROBSON, ZACHARY e HEGGERS, 1984; ZEVIN, GOURLAY e BENOWITZ, 1998).

A nicotina é a substância do cigarro responsável pela tabaco-dependência. Seu papel mais importante é reforçar e potencializar a vontade de fumar, viciando e obrigando ao uso continuado do cigarro pelo fumante (COSTA E SILVA, 1990).

Recentemente tem-se dado maior ênfase aos efeitos deletérios do ato de fumar no organismo humano. Assim, a nicotina, um dos principais componentes do cigarro, tem sido apontada, em estudos atuais, como a principal responsável na dificuldade do reparo das lesões, inibindo a epitelização e exercendo efeito deletério sobre os componentes celulares, levando à hipóxia celular (FRICK e SEALS, 1994).

Diversos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados para tentar explicar esses efeitos, demonstrando deficiências em vários fatores envolvidos na cicatrização de lesões em tabagistas, em áreas tão diversas como a ortopedia (DAFTARI, WHITESEDES, HELLER, GOODRICH, McCAREY e HUTTON, 1994), gastroenterologia (SHIN, LIU, KOO, LUO, SO e CHO, 2002) e dermatologia (ARREDONDO, HALL, NDOYE, NGUYEN, CHERNYAVSKY, BERCOVICH, ORR-URTREGER, BEAUDET e GRANDO, 2003).

A formação de novos vasos sangüíneos participa ativamente da biologia da cicatrização das feridas, sendo um dos componentes básicos de tal processo (TONNESEN, FENG e CLARK, 2000). A angiogênese leva a um aporte adequado de oxigênio, nutrientes, células inflamatórias e remove tecidos necróticos na área da injúria tecidual (LINGEN, 2001; SHERRATT e DALLON, 2002).

Sabe-se que a nicotina é um vasoconstritor que reduz o fluxo sangüíneo tecidual, resultando em isquemia e dificuldade cicatricial. Também aumenta a adesividade plaquetária, aumentando o risco de uma oclusão trombótica microvascular e, conseqüentemente, prejuízo para irrigação sangüínea. Paralelamente, a proliferação de hemácias, fibroblastos e macrófagos é reduzida pela nicotina (SHERWIN e GASTWIRTH, 1990).

O efeito da nicotina no processo cicatricial da parede abdominal foi pouco estudado, bem como seu possível mecanismo de ação, justificando sua investigação no presente estudo.

1.1 OBJETIVOS

O presente experimento tem o intuito de avaliar a influência da nicotina no processo cicatricial da parede abdominal em ratos, mediante os seguintes parâmetros:

- 1 - força máxima;
- 2 - força de ruptura;
- 3 - número de vasos sangüíneos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRIA DA NICOTINA

Em revisão sobre a história da nicotina, FLETCHER (1941) relatou que sua primeira referência na literatura ocorreu em 1571, em estudo de JACQUES GOHORY, editor dos primeiros trabalhos em edição francesa de PARACELSUS, o qual se referiu à nicotina como “óleo do tabaco”. Em 1843, MELSENS chegou à fórmula correta da droga e, após diversas tentativas frustradas de sintetizar em laboratório a nicotina, somente no ano de 1904 o suíço AMÉ PICTET finalmente obteve sucesso. Posteriormente, em 1928, nova síntese da droga foi realizada sob melhores condições por SPATH e BRETSCHNEIDER, mas somente vieram a confirmar os resultados de PICTET.

Segundo COSTA E SILVA (1990), quando Cabral chegou ao Brasil no século XV encontrou nativos aspirando fumaça de rolos feitos de folhas, os quais faziam parte de um ritual mágico-religioso. Também foi relatado o seu uso para fins medicinais.

O uso do tabaco pelos astecas, no México, data de 1000 a.C., segundo estudos antropológicos. No Brasil, nas escavações da Lagoa Santa, em Minas Gerais, foram encontrados cachimbos que se supõem datados de 10 mil anos atrás.

Foram os portugueses que passaram a levar para a Europa as folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*), que eram usadas como troca por outros gêneros. O produto se popularizou pelas mãos de JEAN NICOT, arquivista do rei da França em missão diplomática em Portugal, que o levou para curar as dores de cabeça da rainha francesa. Nesse tempo era igualmente conhecida por erva-santa em virtude das qualidades medicinais que então lhe atribuíam. Os europeus consideravam o tabaco uma verdadeira panacéia; remédio infalível para as enxaquecas, pneumonia, chagas, gota, raiva e servindo até como narcótico e aperitivo (AMARAL, 2001).

A introdução do uso do tabaco na Europa seguiu quatro fases: no século XVII surge o cachimbo e se acentua o uso do tabaco pela alta sociedade; no século XVIII o tabaco é utilizado também sob a forma de rapé e mascado, o uso de escarradeiras é disseminado, até mesmo em hospitais; no século XIX surge o charuto, tornando-se famosos os cubanos e holandeses; finalmente no século XX iniciou-se a sua industrialização sob a forma de cigarro. Seu uso espalhou-se por todo o mundo ajudado pelo desenvolvimento de técnicas avançadas de publicidade e *marketing* (COSTA e SILVA, 1990).

2.2 CICATRIZAÇÃO

O processo cicatricial é vital para o organismo, reparando as lesões induzidas por agressões locais. Inicia-se precocemente, com o processo de inflamação e, ao fim, resulta na regeneração celular e reorganização do tecido mesodérmico, com a substituição das células mortas ou lesadas por células sadias.

Em seu estudo de revisão sobre cicatrização de feridas, WITTE e BARBUL (1997) relatam que o processo cicatricial pode ser dividido em três fases que se inter-relacionam entre si:

1) Fase de hemostasia e inflamação: Tem seu início no momento da lesão e vai até o 5º dia, caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia celular da circulação para o sítio da lesão e ainda liberação local de mediadores químicos e fatores de crescimento. A resposta inflamatória que acompanha qualquer tipo de lesão tecidual constitui uma parte vital no processo de reparo, tanto que é uma máxima válida a que diz: *se não houver inflamação não haverá reparo* (CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984).

Um ferimento é seguido imediatamente por coagulação, sendo que a hemostasia precede a inflamação. A lesão tecidual causa a ruptura de vasos, expondo o colágeno subendotelial às plaquetas, causando a agregação das mesmas e ativação da porção intrínseca da cascata da coagulação. Por meio deste contato e da presença da trombina ocorre a liberação de mediadores químicos, as citocinas (tromboxano A2 e interleucina 1) e fatores de crescimento, tal como o fator de crescimento derivado das plaquetas ou *PDGF*. Esses mediadores químicos

estimulam a multiplicação de fibroblastos e levam ao aumento da permeabilidade vascular, liberação de prostaglandinas e ao estímulo à migração de neutrófilos para o sítio da injúria.

ORGILL e DEMLING (1988) descreveram a ação dos neutrófilos na fagocitose de possíveis microrganismos presentes, bem como na lise de tecido desvitalizado. Essas células apresentam vida curta, sobrevivendo somente por poucas horas após a agressão. Ainda segundo a mesma revisão, são os linfócitos as próximas células a serem atraídas para o sítio injuriado, sendo que seu papel na cicatrização ainda não foi completamente elucidado; porém, sabe-se que estas células liberam mediadores químicos chamados de linfocinas, os quais apresentam poder de quimiotaxia para os fibroblastos.

Em seguida os macrófagos são atraídos por mediadores, tais como fatores plaquetários, linfocinas e produtos de degradação da fibrina, sendo oriundos do próprio tecido ou da diferenciação de monócitos circulantes. Os macrófagos são considerados as células mais importantes da reação inflamatória e desempenham também importante papel na indução da síntese do colágeno, como demonstrado por LEIBOVICH e ROSS (1976).

A redução da resposta inflamatória afeta profundamente a cicatrização, fato este demonstrado clinicamente e experimentalmente em diabéticos e em pacientes tratados com corticosteróides (WITTE e BARBUL, 1997).

2) Fase Proliferativa: Inicia-se em torno do 4º dia e persiste até aproximadamente o 14º dia.

Nesta fase, segundo a revisão de ORGILL e DEMLING (1988), três processos-chave são envolvidos: angiogênese, proliferação fibroblástica e epitelização.

De acordo com o estudo de ARNOLD e WEST (1991), a angiogênese é um componente essencial na cicatrização das feridas. O crescimento dos vasos

sangüíneos é controlado pela ação local de mediadores químicos, gradientes metabólicos, matriz extracelular e forças físicas.

TONNESEN, FENG e CLARK (2000), também em artigo de revisão sobre angiogênese e cicatrização, descrevem que os novos brotos capilares invadem o coágulo da ferida e, dentro de alguns dias, se organizam em uma rede microvascular ao longo do tecido de granulação. Ocorre interação dinâmica entre as células endoteliais, citocinas angiogênicas como *FGF*, *VEGF*, angiopoitina e outros, com a matriz extracelular. Receptores específicos das células endoteliais da matriz extracelular parecem ter papel decisivo na neoformação vascular.

Em outro artigo de revisão, LINGEN (2001) descreve o papel dos leucócitos e das células endoteliais no desenvolvimento da angiogênese e na inflamação da ferida. O autor destaca vários trabalhos que demonstram o importante papel exercido pelos macrófagos na indução e no controle da angiogênese.

Segundo CARRICO, MEHRHOF e COHEN (1984), a nutrição, a oxigenação e o volume circulante são fatores que influenciam a cicatrização das feridas e estão diretamente relacionados com a neoformação de vasos sangüíneos nos tecidos lesados. O fator de angiogênese produzido pelos macrófagos é um quimiotáxico para células mesoteliais e do endotélio vascular, como o *PDGF* liberado pelas plaquetas; assim inicia-se o processo de neovascularização. Quando as margens da ferida são aproximadas, os capilares podem atravessá-las, formando verdadeiras pontes caracterizando a cicatrização por primeira intenção.

Na proliferação fibroblástica, os fibroblastos constituem elementos cruciais da cicatrização e restauração tecidual, sendo as células mais comuns no tecido conjuntivo e os principais produtores de colágeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Em estudo *in vitro*, NEILSON, PHILIPS e JIMENEZ (1982), utilizando linfócitos T e fibroblastos de ratos, chegaram à conclusão de que as linfocinas podem modular a proliferação fibroblástica, inibindo-a ou estimulando-a.

WAHL, WAHL e Mc CARTHY (1978) realizaram estudo introduzindo linfócitos T em culturas de fibroblastos provenientes da pele de cobaias, e obtiveram significativo aumento tanto no número de fibroblastos quanto da produção de colágeno.

3) Fase de maturação ou remodelamento: É a fase mais importante da cicatrização e, classicamente, inicia-se em torno do início da 2ª semana da lesão, tendo como característica principal a deposição de colágeno na ferida. A quantidade e a qualidade dessa proteína é que determinarão a força mecânica do tecido remodelado (WITTE e BARBUL, 1997).

Segundo JUNQUEIRA e CARNEIRO (1995), a proteína colágeno é a mais abundante do corpo dos mamíferos, representando cerca de 1/3 do total das proteínas do organismo humano, sendo, portanto, o principal componente do tecido conjuntivo. Apesar de ser uma molécula complexa, o colágeno apresenta composição bem característica, formada por uma seqüência básica de três aminoácidos: a glicina aparece na proporção de 33,5%, enquanto a prolina e a hidroxiprolina estão presentes na proporção de 12% e 10%, respectivamente. No tecido animal, a hidroxiprolina e hidroxilisina são aminoácidos encontrados essencialmente no colágeno (UDENFRIEND, 1966).

O colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas, as cadeias alfa, que são formadas por cerca de 1000 aminoácidos (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN e GUZMAN, 1979). Estas são configuradas em hélice e unidas por pontes de hidrogênio, sendo cada uma delas codificada por um gene, dando origem a diversos tipos dessa proteína. As mais importantes para a cicatrização são do tipo I e tipo III, presentes na pele e vasos sanguíneos, respectivamente.

Segundo JUNQUEIRA e CARNEIRO 1995, o colágeno tipo I (sintetizado pelos fibroblastos) é o mais freqüente, perfazendo 90% da proteína colágena do corpo dos mamíferos; o colágeno tipo III freqüentemente está associado ao tipo I e também é sintetizado pelos fibroblastos. Esse último é depositado precocemente no tecido em cicatrização e caracteriza um colágeno imaturo; mais tarde, com a remodelação, surge o colágeno do tipo I, de características maduras (WITTE e BARBUL, 1997; CRONIN, JACKSON e DUNPHY, 1968).

A produção celular do colágeno passa por uma série de etapas, que em estudo de revisão realizado por KIVIRIKKO e RISTELI (1976), podem ser assim sintetizadas:

a) no início ocorre a síntese do RNA mensageiro para cada tipo de cadeia alfa;

b) ocorre a hidroxilação de resíduos de prolina e lisina em hidroxiprolina e hidroxilisina;

c) após a glicosilação da hidroxilisina, ocorre a formação da molécula de procolágeno, que contém os chamados peptídeos de registro (que determinam o alinhamento das cadeias protéicas em grupos de três, tudo ocorrendo no Retículo Endoplasmático Rugoso);

d) o procolágeno é transportado até o complexo de Golgi e daí ao meio extracelular; onde perde os peptídeos de registro, originando as chamadas moléculas de tropocolágeno, que se polimerizam para formar as fibras colágenas. A força mecânica do tecido cicatricial é dependente da interligação das moléculas do colágeno.

Para que ocorra uma boa cicatrização é necessário que se faça equilíbrio entre a formação e degradação do colágeno. Sua destruição é mediada pela enzima collagenase, que por sua vez é regulada por citocinas (WITTE e BARBUL, 1997).

2.3 CICATRIZAÇÃO E NICOTINA

Nos últimos anos melhoram os conhecimentos sobre os efeitos nefastos ocasionados pela nicotina na cicatrização das feridas, como a diminuição do fluxo

sangüíneo, reepitelização, osteogênese, assim como a inibição da proliferação e adesão dos fibroblastos e da síntese do colágeno. Diversos autores, nos últimos anos, têm demonstrado estes efeitos por meio de trabalhos clínicos e experimentais.

2.3.1 Trabalhos Clínicos

SARIN, AUSTIN e NICKEL (1974), utilizando Eco Doppler de fluxo, mensuraram a velocidade do fluxo sangüíneo digital em um grupo de 10 fumantes voluntários. A velocidade era aferida após um cigarro ter sido fumado. No grupo controle de não fumantes, com idade semelhante ao grupo de tabagistas, duas medidas eram realizadas no mesmo intervalo. A conclusão a que os autores chegaram foi que mesmo fumando apenas um cigarro, houve redução de 42% da velocidade do fluxo sangüíneo digital nos fumantes.

NEHER (1974) adicionou nicotina a culturas de linfócitos periféricos estimulados a multiplicarem-se com fitohemaglutinina, e comparou a multiplicação celular com linfócitos que não receberam a droga, três dias após. Nas culturas com adição de nicotina a multiplicação celular mostrou-se 6-7% menor do que as culturas livres da droga, o que foi estatisticamente significativo. Concluiu o autor que a nicotina inibe a proliferação de linfócitos periféricos humanos, e que estas células são mais suscetíveis à droga do que outros tipos de células *in vitro*.

MOSELY e FINSETH (1977) foram os primeiros a relatar os efeitos deletérios da nicotina na cicatrização. Os autores descreveram um caso de lesão traumática na mão de paciente com 50 anos de idade, na qual encontraram dificuldade de cicatrização, e atribuíram ao fato de ser ele tabagista. A lesão cicatrizou somente 12 semanas após o paciente ter cessado o seu hábito de fumar. Uma arteriografia foi realizada seis meses após, em que foi demonstrado grave vasoconstrição arterial na mão envolvida após o paciente ter fumado apenas um cigarro. A conclusão dos autores foi que a vasoconstrição associada à nicotina e a conseqüente diminuição da oxigenação local poderiam interferir no processo cicatricial.

CHAMSON, GARRONE, AUGER e FREY (1980) realizaram experimento com cultura de fibroblastos que foram tratados com solução aquosa contendo extrato de tabaco, a fim de determinar seu efeito tóxico mediante verificação da inibição da multiplicação celular. Os resultados demonstraram que, utilizando extrato de tabaco contendo de 15 a 30milimol/litro de nicotina, houve diminuição da extensão do retículo endoplasmático rugoso e aumento no número de mitocôndrias e vacúolos nos fibroblastos. Concluíram os autores que estas modificações caracterizam citotoxicidade e inibição no crescimento celular.

NADLER, VELASCO e HORTON (1983) efetivaram pesquisa em que mediram a prostaciclina PGI₂ na urina de 12 fumantes crônicos e 12 indivíduos não tabagistas. A dosagem foi realizada após os tabagistas fumarem por quatro horas cigarros com alto teor de nicotina (mais do que 1mg por unidade), uma unidade por hora. Nos fumantes crônicos houve significativa redução de PGI₂ na urina, sugerindo que a produção de prostaglandinas seja inibida pela nicotina, podendo ser este um fator associado ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

REES, LIVERETT e GUY (1984) realizaram estudo retrospectivo em que 1.186 pacientes foram submetidos à cirurgia plástica facial (*lift*), num período compreendido entre 1975 a 1981. Todos os pacientes foram operados pela mesma equipe, com somente algumas pequenas variantes na técnica cirúrgica. Quando ocorreram hematomas volumosos associados com esfoliação da pele estes pacientes foram eliminados do estudo. Os autores chegaram à conclusão de que os fumantes têm 12,5 vezes mais chances de sofrer isquemia local e complicações no processo cicatricial do que os não fumantes. Pacientes que fumam têm 7,5% de chance de apresentar complicações em uma cirurgia de *lift* facial, enquanto não fumantes apresentam apenas 2,7% de chance de complicações na mesma cirurgia. Com isso, recomendaram empiricamente que os pacientes cessem o tabagismo por pelo menos 10 dias antes e três semanas após o procedimento cirúrgico.

RENAUD, BLACHE, DUMONT, THEVENON e WISSENDAGER (1984) mediram a taxa de agregação plaquetária em relação aos níveis sanguíneos de nicotina e de carboxihemoglobina em 10 tabagistas que inalaram a fumaça de

cigarros com diferentes taxas de nicotina (0,07 a 1,44mg). O sangue era coletado 10 minutos antes e 10 minutos após fumarem um cigarro. Houve significativo aumento na agregação plaquetária quando foram utilizadas concentrações da droga entre 0,58 e 1,44mg, porém não houve correlação com a taxa de carboxihemoglobina no sangue.

Em estudo de revisão sobre a farmacologia da nicotina, BENOWITZ (1986) relatou que, após sua absorção, a droga é difundida rapidamente, especialmente para o cérebro, sendo em seguida metabolizada primariamente no fígado, mas também, em menor extensão, nos pulmões e rins. Seus maiores metabólitos são a cotinina e o óxido-n-nicotínico, e nenhum deles parece ser ativo. O autor continua sua revisão relatando os efeitos cardiovasculares da nicotina, tais como o aumento do fluxo cardíaco e a vasoconstrição periférica, em decorrência do aumento do nível de catecolaminas circulantes, por estimulação direta da nicotina nas supra-renais e gânglios simpáticos periféricos.

SIANA, REX e GOTTRUP (1989) realizaram estudo com 120 mulheres, das quais 69 fumantes e 51 não fumantes, submetidas à laparotomia para esterilização. Foram observadas as cicatrizes cirúrgicas abdominais com relação à sua largura, comprimento e coloração usando escore predeterminado e realizado pela própria paciente. Com relação à largura, as cicatrizes das fumantes foram, em média, 7,4 mm, enquanto das não fumantes mediram 2,5mm. O comprimento não apresentou diferença entre os dois grupos. Com relação à coloração, 26% das fumantes apresentaram coloração não estética, quando comparado com os 12% das não fumantes. Os autores concluíram que as pacientes fumantes tiveram resultados cosméticos significativamente piores quando comparados aos das não fumantes.

LIND, KRAMHOFT e BODTKER (1991) em artigo retrospectivo sobre amputações de membros inferiores, realizaram estudo com 165 pacientes, dos quais 44 fumavam cigarros, 33 charutos e 88 eram não fumantes. Em fumantes de cigarro o risco de reamputação do membro inferior foi 2,5 vezes maior que em fumantes de charutos e não fumantes. Os autores concluíram que a nicotina do cigarro reduz o fluxo sangüíneo capilar, aumentando o risco de formação de

microtrombos, e elevando a taxa de reamputação de membros inferiores nos fumantes.

SILVERSTEIN (1992), em seu artigo de revisão sobre tabagismo e cicatrização de feridas, relata que os efeitos da nicotina, do monóxido de carbono e do cianido de hidrogênio causam, em conjunto, anóxia tecidual, hipóxia celular, diminuição da proliferação de células epiteliais, vasoconstrição, decréscimo da capacidade de carreamento do oxigênio pelas células vermelhas e alterações das enzimas sistêmicas requeridas para a cicatrização das feridas.

REUS, COLEN e STRAKER (1992), em estudo retrospectivo, compararam 104 enxertos de tecidos livres em 93 fumantes com 58 enxertos semelhantes, em 51 pacientes não fumantes. A região da ferida, sua etiologia e sítios de recepção eram similares em ambas as populações. Com exceção da alta taxa de doença pulmonar obstrutiva crônica nos fumantes, outros fatores de co-morbidade eram similares entre os grupos. Este trabalho demonstrou que, nos fumantes, houve aumento na taxa de complicações na periferia dos enxertos, decorrente da ação da nicotina em reduzir o fluxo sanguíneo periférico interferindo na cicatrização da ferida.

FRICK e SEALS (1994), em estudo de revisão sobre a influência do tabagismo na cicatrização de lesões, relataram que, apesar das controvérsias quanto ao mecanismo de ação, existe consenso de que o tabagismo dificulta o processo cicatricial normal das feridas.

TIPTON e DABBOUS (1995), em seu estudo para determinar os efeitos da nicotina, extraíram fibroblastos da gengiva de um homem sadio não tabagista, e realizaram culturas destas células. Foi então adicionada nicotina nas concentrações entre 0,001% e 0,05% (comparáveis aos níveis medidos na saliva de fumantes crônicos). As possíveis alterações na proliferação celular e na produção de colágeno tipo I foram comparadas às culturas controle. Os resultados mostraram que, nas concentrações da droga entre 0,05% e 0,075%, houve intensa vacuolização dos fibroblastos. Todas as concentrações testadas da nicotina

causaram significativa inibição da proliferação fibroblástica, cuja intensidade se mostrou dose-dependente. Concentrações testadas da droga iguais ou superiores a 0,075% causaram aumento significativo na atividade da collagenase. O estudo da proliferação dos fibroblastos deu-se após 24 horas de incubação a 37 graus Celsius e a pesquisa da produção de colágeno e da atividade da collagenase foi feita após seis dias de incubação. Os autores concluíram que a nicotina inibe a proliferação de fibroblastos gengivais humanos, bem como a produção originária dessas células de colágeno tipo I, enquanto aumenta a lise dessa proteína pelo aumento da atividade da collagenase, *in vitro*.

GIANNOPOULOU, GEINOZ e CIMASONI (1999) examinaram os efeitos *in vitro* da nicotina na proliferação e quimiotaxia de culturas de fibroblastos oriundos do ligamento periodontal do dente pré-molar extraído de cinco voluntários. As concentrações de nicotina variaram entre 5ng/ml a 250µg/ml, e o estudo foi realizado após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de incubação, sendo os dados obtidos comparados com culturas controle, sem o uso da droga. As células foram examinadas morfolologicamente, encontrando-se intensa vacuolização nas concentrações de 1µg e 2µg. O grau de inibição da proliferação fibroblástica variou de 92% (concentração de 2µg/ml) a 0% (5ng/ml). Houve inibição dose-dependente da migração celular, que variou de 15% com a mais baixa concentração de nicotina (50ng/ml) até quase 90% com a mais alta (5µg/ml). Os autores concluíram que a nicotina inibe a proliferação, fixação e a migração de fibroblastos do ligamento periodontal *in vitro*.

MOLLER, VILLEBRO, PEDERSEN e TONNESEN (2002) realizaram estudo randomizado para avaliar o efeito da abstinência ao fumo nas complicações pós-operatórias em intervenções cirúrgicas de quadril e joelho. Foram incluídos 120 pacientes, divididos em grupo controle e grupo abstinência, que cessaria ou pelo menos reduziria pela metade o ato de fumar, seis a oito semanas antes do procedimento cirúrgico. Oito do grupo controle e quatro do grupo abstinência foram excluídos da análise final por terem sua cirurgia adiada ou suspensa. Assim, 52 e 56 pacientes foram respectivamente avaliados. A taxa de complicação total foi de 18%

no grupo abstinência e 52% no grupo controle ($p=0,003$). A principal complicação relatada foi com relação à ferida operatória (5% no grupo abstinência vs 31% no grupo controle, $p=0.001$). Os autores concluíram que a abstinência ao fumo por seis a oito semanas, antes do ato cirúrgico, reduz a morbidade e complicações na ferida cirúrgica no pós-operatório.

SORENSEN, KARLSMARK e GOTTRUP (2003) realizaram estudo randomizado para avaliar a taxa de infecção de feridas em fumantes e não fumantes no pós-operatório. Foram avaliados 78 indivíduos saudáveis (48 fumantes e 30 não fumantes) seguidos por 15 semanas. Todos os fumantes utilizaram 20 cigarros ao dia na primeira semana, após foram randomizados em três grupos: continuaram fumando 20 cigarros ao dia, pararam de fumar e receberam disco intradérmico de nicotina (25mg/dia) ou disco intradérmico de placebo. No final da 1ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas, foram realizadas feridas por punção biópsia da pele na face lateral da região sacral dos indivíduos fumantes. O mesmo procedimento foi feito em seis dos indivíduos não fumantes. No restante a ferida foi realizada apenas uma vez. Todas as feridas foram seguidas para avaliar o possível desenvolvimento de infecção. Nos fumantes a taxa de infecção foi de 12% comparada com 2% dos não fumantes. A infecção da ferida foi significativamente menor nos que pararam de fumar e receberam implante de nicotina quando comparados aos que continuaram a fumar após 4, 8 e 12 semanas. Não houve diferença entre os que receberam implante de nicotina ou placebo. Os autores concluíram que os fumantes têm taxa de infecção de ferida maior que os não fumantes, e que quatro semanas de abstinência do cigarro reduz a incidência de infecções em feridas.

2.3.2 Trabalhos Experimentais

RICHARDSON, MORTON e HOWARD (1977) realizaram estudo experimental em 20 ratos machos *Sprague-Dawley*, com peso e idade similares. Os animais foram divididos em dois grupos, sendo o primeiro submetido à administração de nicotina diluída em água para beber, e o segundo grupo recebendo apenas água, num período compreendido de 15 semanas. No final desse tempo, foram aferidas a pressão arterial sistêmica, mensurada por um cateter na

artéria carótida, e a velocidade dos eritrócitos nos capilares do mesentério, por meio de microscopia óptica. A diferença da pressão arterial sistêmica entre os dois grupos não foi significativa, mas a velocidade dos glóbulos vermelhos foi significativamente menor nos capilares mesentéricos do grupo que recebeu nicotina, em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que a administração de nicotina em ratos reduz a velocidade do fluxo sanguíneo capilar mesentérico.

Posteriormente MOSELY, FINSETH e GOODY (1978) realizaram experimento utilizando oito coelhos que receberam uma dose de nicotina por via intraperitoneal de 2mg por kg de peso, duas vezes ao dia, por 5 dias no pré-operatório e por 21 dias após a operação. Foram realizadas lesões cutâneas de forma quadrangular de 2 x 2cm na orelha dos animais, de maneira padronizada, preservando a artéria central e a veia marginal. A análise da cicatrização foi efetuada medindo-se macroscopicamente o tecido cruento a cada dois dias por meio de um modelo traçado no papel, desde o trauma até o 21º dia de evolução. Os resultados foram comparados com oito animais controle, que receberam placebo pelo mesmo período. Os autores concluíram que a nicotina retardou a cicatrização no período do 6º ao 10º dia. As feridas cicatrizaram de maneira igual antes e após este período. Relataram que três fatores poderiam ser responsáveis por estes resultados: 1) dano causado diretamente aos macrófagos e fibroblastos; 2) efeito vasoconstritor com decréscimo nutricional e do fluxo sanguíneo e 3) inibição da epitelização.

LAWRENCE, MURPHY, ROBSON e HEGGERS (1984) realizaram estudo experimental no qual uma câmara foi construída para expor ratos à fumaça do cigarro. Foram utilizados 18 ratos no experimento em que retalhos pediculados, tipo *Mc Farlane*, eram confeccionados no dorso. Dez animais foram expostos à fumaça de cinco cigarros por períodos de duas horas, num total de cinco exposições ao dia, de maneira intermitente, durante sete dias no pós-operatório. A viabilidade do retalho foi então avaliada. No grupo controle, expostos apenas ao ar ambiente, a taxa de viabilidade dos retalhos foi de 75,2%, enquanto a mesma foi de 40,1% nos ratos expostos à fumaça do cigarro ($p < 0,01$). Os autores concluíram que o uso do

cigarro no período pós-operatório é prejudicial à viabilidade de retalhos pediculados, em ratos.

NOLAN, JENKINS, KURIHARA e SCHULTZ (1985) realizaram estudo utilizando amostra de 344 ratos fêmeas *Fischer*, que eram expostos à fumaça do cigarro em uma máquina de exposição tipo Maddox-ORNL, 21 dias antes e sete dias após a realização de um retalho pediculado, tipo *Mc Farlane*, confeccionado no dorso do animal. A conclusão, após comparados os resultados com o grupo controle exposto ao ar ambiente, foi que nos animais expostos à fumaça do cigarro, a taxa de necrose dos retalhos foi de 78%, enquanto a dos não expostos foi de 56%.

CRAIG e REES (1985) estudaram os efeitos da inalação da fumaça do cigarro em 30 hamsters *Syrian Golden*, que foram divididos em grupos de 10. O grupo A foi utilizado como controle; o grupo B foi submetido à exposição da fumaça do cigarro, em máquina produtora da mesma, por um período de seis semanas anteriores à operação, mas não no pós-operatório. O grupo C foi submetido ao contato com a fumaça do cigarro por seis semanas antes e duas semanas após a operação. Em todos os animais um retalho cutâneo padronizado foi realizado, e a análise foi feita após duas semanas. Os retalhos do grupo A tornaram-se viáveis e sem necrose; no grupo B, dois dos 10 apresentaram necrose terminal e seis dos 10 retalhos realizados no grupo C também apresentaram necrose. Estes autores concluíram que a inalação da fumaça do cigarro no período pré e pós-operatórios causa efeitos adversos na cicatrização de retalhos cutâneos em hamsters, quando comparado ao grupo controle.

FORREST, PANG e LINDSAY (1985) realizaram dois experimentos utilizando ratos e cobaias. No primeiro, foram estudados retalhos cutâneos padronizados tipo *Mc Farlane* em 80 ratos *Sprague-Dawley*. A nicotina foi aplicada pela primeira vez por via subcutânea em concentrações de 2, 4, 8 ou 16mg por kg de peso ao dia, divididas em duas aplicações. A administração foi realizada por quatro semanas antes e uma semana após as operações. A análise foi feita um mês após a cirurgia e comparada com os animais controle. O tamanho da área viável foi significativamente menor nos ratos tratados com nicotina.

No segundo experimento, 12 cobaias *Yorkshire* foram divididos em dois grupos, sendo o grupo A tratado com injeções intramusculares de solução salina e o grupo B com injeções intramusculares de nicotina, na dose de 8mg por kg peso ao dia, divididas em duas aplicações. A administração foi realizada por quatro semanas antes e uma semana após a confecção de retalhos cutâneos padronizados na região dorsal. O fluxo sangüíneo na ponta dos retalhos foi estudado com o auxílio de uma técnica radioativa em três animais do grupo A e três do grupo B, seis horas após o procedimento cirúrgico. No restante dos animais a análise foi semelhante ao primeiro experimento. Concluíram os autores que o fluxo sangüíneo na ponta dos retalhos era menor nas cobaias tratadas com nicotina, e a área viável dos retalhos era também significativamente menor que nas cobaias controle.

Em outro estudo, FORREST, PANG, e LINDSAY (1987) administraram nicotina por via subcutânea, em ratos *Sprague-Dawley*. Em seu primeiro experimento, 80 animais foram divididos em cinco grupos de 16; quatro grupos receberam nicotina subcutânea nas doses 1, 2, 4, e 8mg por kg de peso, respectivamente, e o grupo controle 0,2ml de solução salina, por quatro semanas. Foi realizado retalho cutâneo padrão no dorso e, a nicotina foi mantida no pós-operatório por mais uma semana. A avaliação foi efetivada e comparada com o grupo controle. Os resultados demonstraram diminuição significativa da área de retalho viável a partir da dose de 2mg por kg, duas vezes ao dia. No segundo experimento, o mesmo procedimento foi adotado, porém a administração de nicotina foi iniciada somente duas semanas antes da operação. Não foi encontrada diferença significativa na área viável dos retalhos entre o grupo controle e os grupos experimentais. No terceiro experimento, foi estudado o fluxo capilar sangüíneo e a perfusão distal dos retalhos cutâneos. Os animais foram divididos em dois grupos de 17, sendo o grupo controle submetido a aplicações diárias de 0,2ml de solução salina, enquanto o grupo tratado recebia dose de nicotina de 2mg dia por kg de peso, divididas em duas tomadas, por período de cinco semanas. Os retalhos cutâneos foram então realizados, e após 6 horas da cirurgia o fluxo sangüíneo capilar de perfusão distal e o débito cardíaco eram aferidos por técnica radioativa e pelo cateterismo do ventrículo esquerdo, respectivamente. O débito cardíaco foi similar em ambos os grupos, porém o fluxo sangüíneo de perfusão distal foi

significativamente menor nos ratos tratados com nicotina. Concluíram os autores que os efeitos deletérios da nicotina são tempo e dose dependentes, pois eles só foram identificados em doses iguais ou superiores a 2mg por kg, em duas doses diárias e, com uso por período pré-operatório maior do que duas semanas.

Os pesquisadores FORREST, PANG e LINDSAY (1991) publicaram outro trabalho experimental cujo objetivo era o de estudar os efeitos da administração de nicotina por um período prolongado. Utilizaram baixa dose da droga (0,6mg por kg, via subcutânea, duas vezes ao dia), que foi administrada por 24 semanas pré-operatoriamente, em dois grupos de 15 ratos designados de A e B. Um terceiro grupo de 15 animais recebeu solução fisiológica a 0,9% e serviu como controle. Foram então realizados retalhos cutâneos padronizados no dorso dos animais do grupo controle e do grupo A. Nestes últimos, a administração de nicotina continuou por mais sete dias, quando então ocorreu a morte e foi realizada a avaliação pós-operatória. No grupo B, a administração da droga foi interrompida após 24 semanas e a operação foi realizada duas semanas após. O grupo A apresentou diminuição significativa da área viável do retalho, quando comparado com o grupo controle; já o grupo B não apresentou diferença estatisticamente importante, em comparação com o controle. Os autores concluíram que a administração de nicotina por tempo prolongado influenciou negativamente a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Esses efeitos são reversíveis após duas semanas de interrupção da administração da substância. Os efeitos deletérios da administração a longo prazo foram similares aos encontrados quando a nicotina foi utilizada em altas doses por período curto de tempo (2mg por kg, 2 vezes ao dia, por 4 semanas).

Em estudo experimental, MEDEIROS, CARVALHO, OLIVEIRA MEDEIROS, TEIXEIRA, FARIA, FRANÇA, RAMOS e DANTAS FILHO (1997) utilizaram 16 ratos da raça *Wistar*, divididos aleatoriamente. No grupo A (estudo), foi implantado disco de nicotina subcutânea em região dorsal, na dose de 5mg/kg de peso dia, trocados em dias alternados. No grupo B (controle), foram utilizados discos de celulose com o mesmo diâmetro sem nicotina. Esta dose foi iniciada cinco dias antes do procedimento cirúrgico, que consistiu de laparotomia mediana de 5cm, interessando a pele até o peritônio. No 10º dia de pós operatório, os animais receberam dose

letal de anestésico. Foi retirado o segmento da parede abdominal incluindo a ferida da aponeurose. Após 48 horas de fixação em formol, as peças foram processadas mediante coloração pela hematoxilina e eosina para estudo em microscopia óptica. As lâminas foram examinadas com o objetivo de quantificar os achados de acordo com o método de MYERS, POSTLETHWAIT e SMITH (1961), no qual uma graduação dos dados histológicos é baseada na inflamação aguda, inflamação crônica, necrose, abscesso, fibrose, tecido de granulação, granuloma e colágeno. Os valores atribuídos a cada variável vão de 0 a 4. Os resultados mostraram que no grupo A os dados histológicos atingiram 129 pontos e no grupo B 264 pontos, caracterizando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$). Os autores chegaram à conclusão que, em ratos, a nicotina por via subcutânea exerce efeito deletério sobre a cicatrização da parede abdominal.

VILLABLANCA (1998) postulou que a nicotina tem papel importante na arteriogenese. Em seu experimento, usou cultura de células endoteliais de artérias pulmonares bovinas, incubando estas com nicotina na presença e ausência de hidroxirúria (um inibidor da síntese de DNA), soro, plasma humano pobre em plaquetas e fatores de crescimento endotelial derivados das plaquetas. A nicotina estimulou significativamente a síntese de DNA e a proliferação de células endoteliais quando comparada a outras substâncias.

HOLLINGER, SCHMITT, HWANG, SOLEYMANI e BUCK (1999) realizaram estudo experimental utilizando 60 ratos *Long Evans*, divididos em quatro grupos. O primeiro grupo, em número de 6, foi o grupo controle. O segundo grupo foi subdividido em três subgrupos de seis ratos, cada qual recebendo a dose de nicotina de 12,5, 25 e 50mg/l de água. O procedimento cirúrgico consistiu na realização de duas pequenas fraturas no osso parietal com 4mm de diâmetro. No terceiro e quarto grupos a mesma metodologia foi utilizada. A administração da nicotina variou entre os grupos 28 dias antes do procedimento cirúrgico e 28 dias após, enquanto apenas o quarto grupo recebeu nicotina todos os dias. As avaliações eram realizadas com radiografias locais no décimo quarto e vigésimo oitavo pós-operatório, quando então os ratos foram mortos para estudo histológico.

Os autores concluíram que a nicotina influencia a cicatrização óssea em ratos, e seus efeitos são tempo e dose dependentes.

JACOBI, JANG, SUNDRAM, DAYOUB, FAJARDO e COOKE (2002) propuseram em seu estudo que a nicotina acelera a angiogênese e cicatrização de feridas em camundongos diabéticos através de via colinérgica endógena para angiogênese mediada por receptores nicotínicos acetilcolinérgicos. Foi realizado retalho cutâneo no dorso dos animais, e estes foram então divididos em grupos de cinco animais e tratados com soluções tópicas de nicotina, solução salina, *bFGF*, solução agonista e antagonista dos receptores nicotínicos acetilcolinérgicos. Concluíram os autores que a nicotina acelera a cicatrização de feridas em ratos diabéticos, bem como seus efeitos na neovascularização foram semelhantes aos do *bFGF*.

PINTO, BOSCO, OKAMOTO, GUERRA e PIZA (2002) realizaram estudo experimental em 80 ratos machos *Rattus norvegicus albinus*, pesquisando os efeitos da administração da nicotina no processo de reparo de alvéolos dentais. Os animais foram divididos em quatro grupos. Nos dois grupos tratados, os ratos receberam, respectivamente, uma e duas doses diárias de hemissulfato de nicotina. Nos grupos controle, os animais receberam solução salina estéril de acordo com o protocolo estabelecido para o grupo tratado. Todas as soluções foram aplicadas pela via subcutânea durante todo o período experimental até o dia da morte dos animais. Os autores concluíram que a administração de nicotina retarda o processo de reparo alveolar, sendo este diretamente relacionado à dosagem da droga injetada.

HEESCHEN, WEIS e COOKE (2003) usaram modelo de isquemia de membro para determinar se a nicotina poderia aumentar a arteriogênese. Foram usados 85 coelhos albinos em que a oclusão da artéria femoral unilateral foi realizada. Aos animais foram administradas concentrações diferentes de nicotina e *bFGF* intra-arterial. O fluxo sanguíneo do membro isquêmico era determinado por Doppler arterial. Após 21 dias as mudanças morfológicas foram avaliadas por imunohistoquímica e angiografia. Os autores concluíram que, em curto prazo de

tempo, a nicotina promove angiogênese e arteriogênese em membro isquêmico de coelhos.

MEDEIROS, LIMA, DANTAS FILHO, MELO e AZEVEDO (2003) realizaram estudo randomizado para avaliar o efeito da nicotina na cicatrização da camada músculo-aponeurótica da parede abdominal de ratos. Foram usados 16 ratos da raça *Wistar* pesando em média 210 ± 8 g, separados aleatoriamente em dois grupos de oito. No grupo A (estudo), foi implantado disco de nicotina subcutânea em região dorsal, na dose de 5mg/kg de peso dia, trocados em dias alternados. No grupo B (controle), foram utilizados discos de celulose com o mesmo diâmetro sem nicotina. Esta dose foi iniciada cinco dias antes do procedimento cirúrgico, que consistiu de laparotomia mediana de 5cm, interessando a pele até o peritôneo. Tubo de silicone multiperfurado foi implantado no subcutâneo a 1cm da lesão da parede abdominal. No 10º dia pós-operatório foi colhido 1ml de líquido seroso do tubo de silicone por punção percutânea para dosagem da pO_2 , e os animais receberam dose letal de anestésico. Foi ressecado um segmento da camada músculo-aponeurótica com 2cm de largura para tensiometria, em seguida processado e corado em hematoxilina e eosina para análise quantitativa dos dados histopatológicos em sistema digitalizado. A análise estatística foi feita pelo ANOVA e teste *Newman-Keuls*, com significância 0,05. No grupo A, a pO_2 do líquido tecidual atingiu o valor $17,75 \pm 3,4$ mmHg e no grupo B (controle) $49,75 \pm 6,4$ mmHg ($p < 0,001$). A resistência à tensão apresentou o valor de $728,5 \pm 161,75$ gf no grupo A e $1241,6 \pm 232$ gf no grupo B ($p < 0,01$), coincidindo com os achados da pO_2 . A densidade média dos elementos histopatológicos estudados foi de $105 \pm 17,1$ nos animais do grupo A e $146,2 \pm 8,8$ no grupo B ($p < 0,01$). Após a avaliação da pO_2 tecidual, tensiometria e histopatologia, os autores concluíram que a nicotina subcutânea exerce efeito deletério sobre a cicatrização de lesões da parede abdominal de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Aplicaram-se, neste trabalho, as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2000). Utilizou-se a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1975). Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro de Pesquisas Cirúrgicas do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná e no Instituto Tecnológico do Laboratório Central de Pesquisa e Desenvolvimento do Paraná – LACTEC.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Utilizaram-se para a realização do presente estudo 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), *Wistar*, com idade variando de 160 a 200 dias (média de 180 dias) e procedentes do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). O peso deles foi de 280 ± 20 g.

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais foram alojados em grupos de cinco, em gaiolas de polipropileno, de dimensões padronizadas, sendo mantidos em ciclo de 12 horas de claridade por 12 horas de escuridão e na temperatura ambiente constante de 24 graus Celsius. Os ratos foram alimentados com ração própria para a espécie (Nuvilab CR1, Nuvital, Colombo, PR) e tiveram livre acesso à água durante todo o experimento.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos, de maneira aleatória, em dois grupos: Grupo N, com 30 animais, submetidos à aplicação de nicotina e Grupo C, com 30 animais, submetidos à aplicação de solução fisiológica a 0,9%. Cada grupo foi, por sua vez,

dividido em três subgrupos, contendo 10 ratos cada, de acordo com a data da morte, no 7^o, 14^o ou 28^o dia. Suas respectivas denominações são:

Grupo N	Grupo C
Subgrupo N7 com 10 ratos	Subgrupo C7 com 10 ratos
Subgrupo N14 com 10 ratos	Subgrupo C14 com 10 ratos
Subgrupo N28 com 10 ratos	Subgrupo C28 com 10 ratos

3.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Administração de Nicotina ou Solução Fisiológica Pré-Operatórias

Nos animais do grupo N foi administrada nicotina (*Nicotine di-tartrate salt, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA*), por via subcutânea (figura 1), na dosagem de 2mg por Kg de peso, duas vezes ao dia (12/12 horas), diluída em 0,1ml de solução fisiológica a 0,9% e ajustada para pH 7,4, por um período de 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico.

Nos animais do grupo C foi aplicada solução fisiológica a 0,9%, no volume de 0,1ml, duas vezes ao dia (12/12 horas), por via subcutânea e sendo ajustada para pH 7,4. O período de administração foi o mesmo da nicotina. As citadas soluções foram administradas na região dorsal do animal, utilizando-se agulha 13 x 4,5. Os ratos foram pesados semanalmente e a dose de nicotina ajustada, quando necessário.

FIGURA 1 – ADMINISTRAÇÃO DA NICOTINA SUBCUTÂNEA EM REGIÃO DORSAL



3.4.2 Preparo e Procedimento Operatório

No 28º dia de aplicação de nicotina ou solução fisiológica os animais foram submetidos à retirada da ração pelas 12 horas prévias à operação, mantendo-se água *ad libitum*. O procedimento cirúrgico foi realizado no dia seguinte.

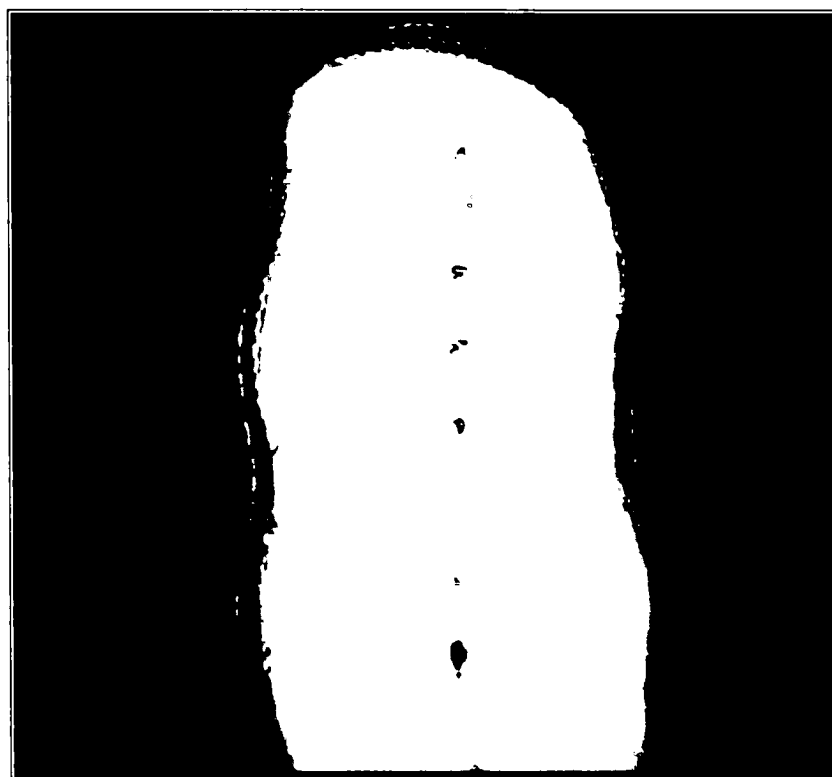
3.4.3 Anestesia

Os ratos receberam indução anestésica inalatória com éter sulfúrico (Éter, Farmácia Magistral, Curitiba, PR), em campânula fechada, considerando-se os animais anestesiados quando eles se apresentavam sem reação ao manuseio. Depois disso foram mantidos com o mesmo anestésico em sistema aberto. A dose anestésica aplicada foi considerada adequada pela observação da amplitude e frequência dos movimentos respiratórios de cada animal. Após a indução anestésica foram anotados, na ficha de protocolo, o grupo e subgrupo do animal, assim como a data da operação.

3.4.4 Preparo da Pele e Posicionamento na Mesa Operatória

Procedeu-se à tricotomia da parede abdominal ventral. Em seguida, o rato foi fixado com fita adesiva na prancheta cirúrgica, em posição de decúbito dorsal, e mantendo-se seus membros em extensão. Foi feita demarcação da pele com caneta própria Pilot®, marcando os extremos da incisão a intervalos de 1cm (figura 2), para se manter plano de sutura uniforme, conforme técnica proposta por SEID, OWENS, POOLE e MEEKS (1995). Realizou-se, então, a antissepsia tóraco-abdominal com solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10% e a delimitação do abdômen com campos cirúrgicos esterilizados.

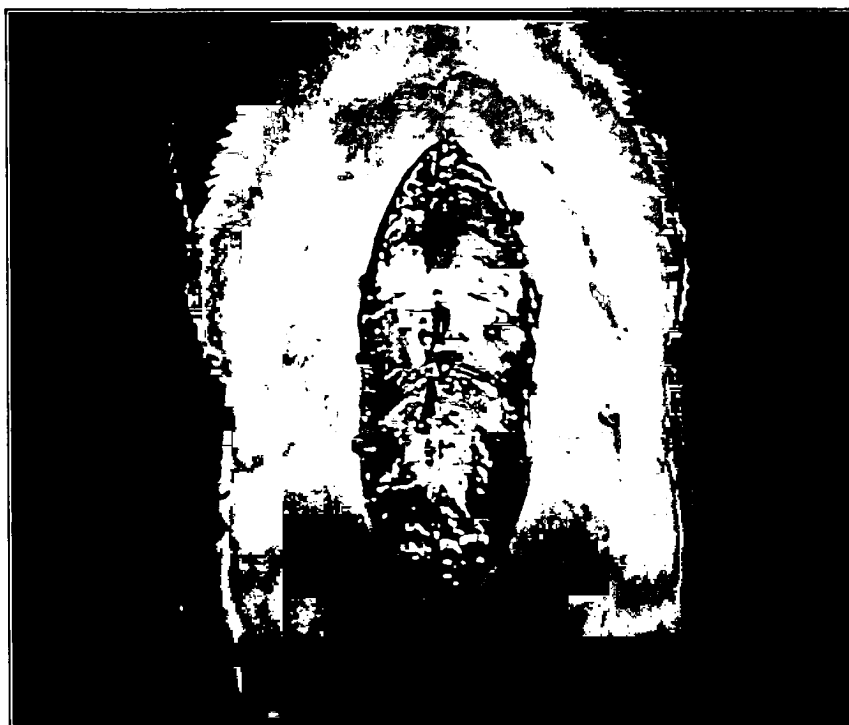
FIGURA 2 - DEMARCAÇÃO DA PELE PARA A INCISÃO.



3.4.5 Procedimento Operatório

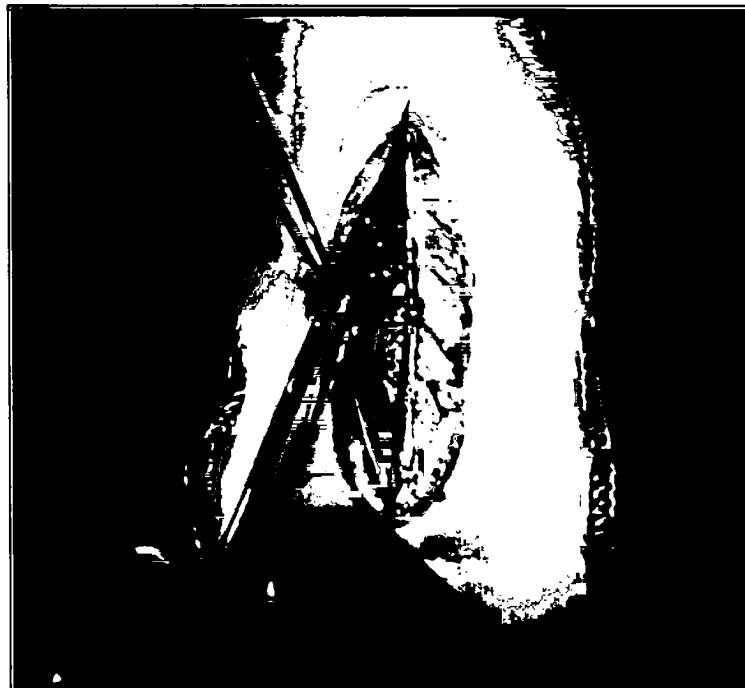
Realizou-se incisão mediana de 6cm de extensão, com bisturi de lâmina 15, dirigindo-se em sentido caudal, interessando pele e tecido celular subcutâneo (figura 3).

FIGURA 3 - INCISÃO DA PELE E TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO.



A diérese dos planos aponeurótico, muscular e peritoneal iniciou-se com incisão de aproximadamente 1cm a bisturi, realizada na comissura caudal da incisão. Com uma tesoura de íris procedeu-se, então, à ampliação da laparotomia no mesmo sentido da incisão da pele, totalizando uma abertura de 6cm em todos os planos da parede abdominal (figura 4) .

FIGURA 4 – ABERTURA DOS PLANOS APONEURÓTICO, MUSCULAR E PERITONEAL



Foi realizada sutura contínua, não ancorada, em bloco, interessando a aponeurose e musculatura (figura 5). Utilizou-se fio monofilamentar de polipropileno 4-0, agulha 3/8 (*Prolene, Ethicon, São José dos Campos-SP*).

FIGURA 5 – SUTURA CONTÍNUA DO PLANO MÚSCULO-APONEURÓTICO



A seguir foi feito o fechamento da pele com uma sutura contínua não ancorada utilizando-se fio monofilamentar de nylon 4-0, agulha 3/8 (*Mononylon, Ethicon, São José dos Campos-SP*).

3.4.6 Pós-Operatório

Os animais foram transferidos para gaiolas próprias, identificadas por grupo e subgrupo, para acompanhamento pós-operatório e observados até a recuperação de sua atividade motora normal, quando eram transferidos para as gaiolas originais, previamente identificadas e nas mesmas condições ambientais do período pré-operatório.

Os ratos tiveram livre acesso à água e à ração após o procedimento operatório. A administração de nicotina ou solução fisiológica manteve-se até mesmo no dia da operação e por mais 7, 14 ou 28 dias, conforme o subgrupo do animal e nas mesmas condições já relatadas.

No exame físico diário dos ratos observaram-se as condições gerais e o aspecto da ferida operatória quanto à possível ocorrência de sangramento, infecção, deiscência da sutura da pele e/ou evisceração.

3.4.7 Morte dos Animais e Aferições

Realizou-se a morte de 20 animais (10 de cada subgrupo) nos dias 7, 14 e 28 de pós-operatório, da seguinte maneira: foram feitas anestesia inalatória com dose letal de éter e reposição dos animais na prancheta cirúrgica com antissepsia abdominal, conforme descrição anterior.

Constatado o óbito do animal, os retalhos foram preparados com a retirada da pele e tecido celular subcutâneo e retirada dos fios de sutura da aponeurose e da musculatura (figura 6).

FIGURA 6 – RETIRADA DA PELE, TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO E FIO DE SUTURA



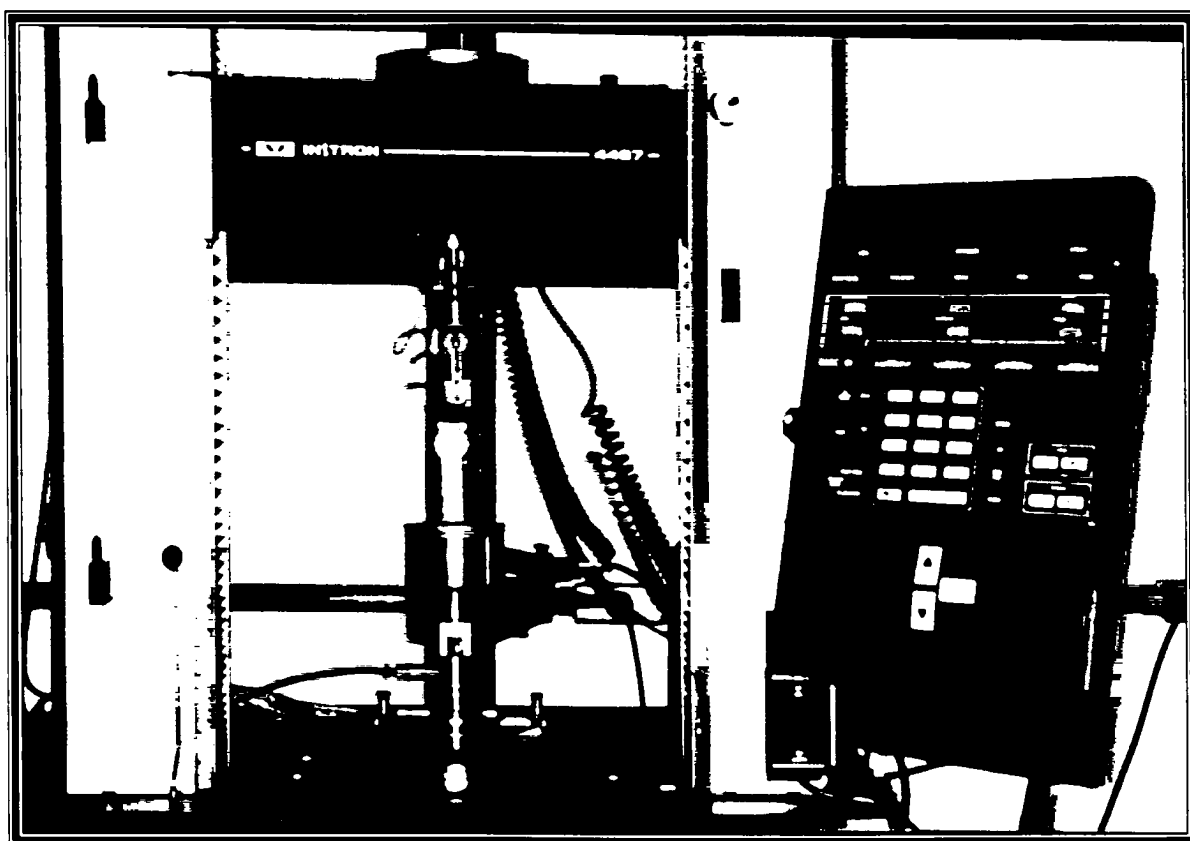
Foram então preparados os corpos de prova para ruptura no local da cicatriz (Figura 7), segundo a técnica descrita por NASH (1972) e KNOLMAYER, CORNELL, BOWYER, McCULLOUGH e KOENIG (1996).

FIGURA 7 – PREPARAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA



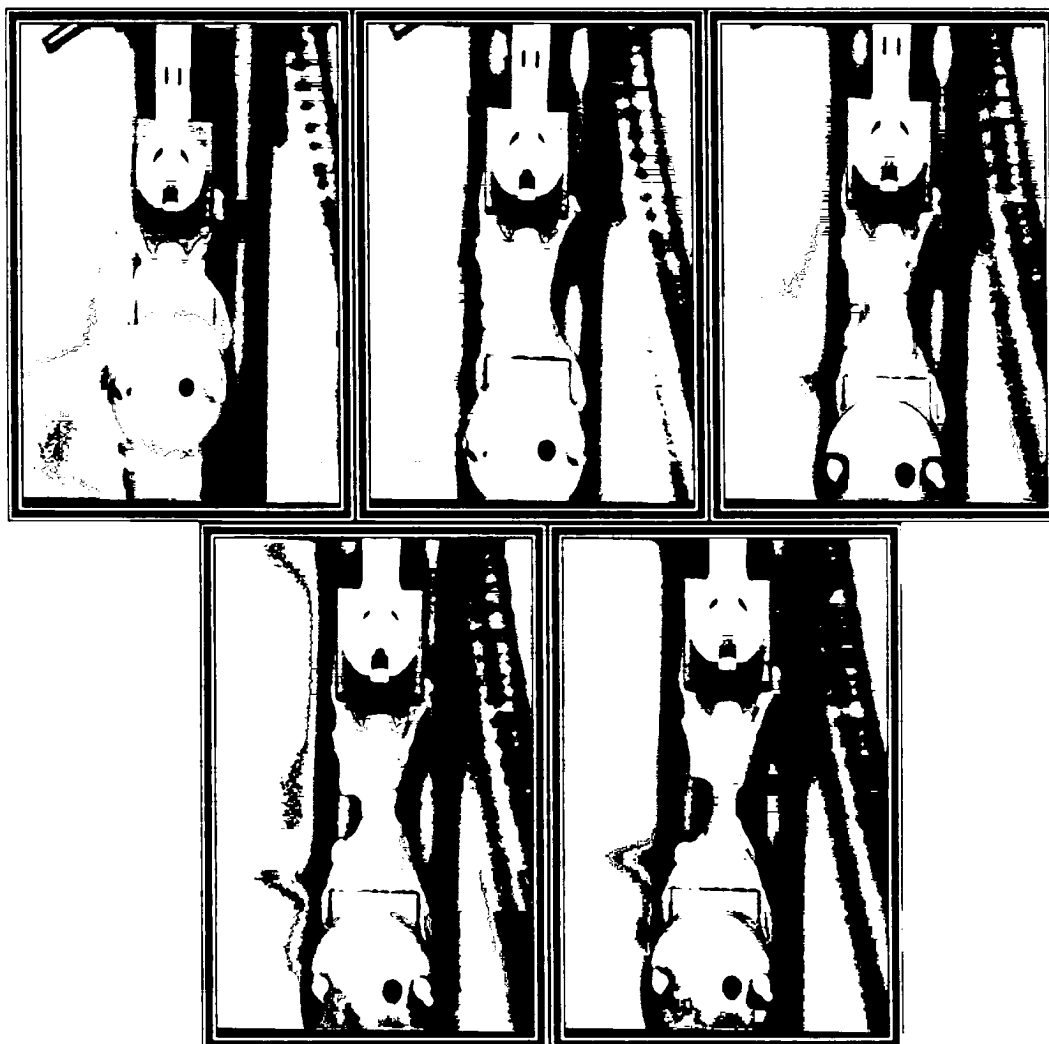
O segmento cranial foi imerso em solução fisiológica a 0,9%, e logo após submetido à análise tensiométrica, no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento da Universidade Federal do Paraná – LACTEC, por meio de uma máquina de tração computadorizada, marca *Instron*, modelo 4467 (*Instron, Londres, Reino Unido*), com garras de pressão pneumáticas e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização do *software Instron* série IX, versão 7.26.00, protegidas com papel de filtro e capacidade para três toneladas (figura 8).

FIGURA 8 – MÁQUINA DE TRAÇÃO COMPUTADORIZADA - INSTRON 4467



Para este estudo foi utilizada uma célula de carga para 10kg, com sensibilidade de 50g, tracionada na velocidade de 50mm por minuto, até a ruptura total do corpo de prova (figura 9). Para a calibragem da máquina de tração, seguiram-se os mesmos valores utilizados pelo experimento de COELHO (1999), que ocupou este mesmo equipamento para se determinar a tensão entre as cicatrizes das laparotomias transversas e longitudinais.

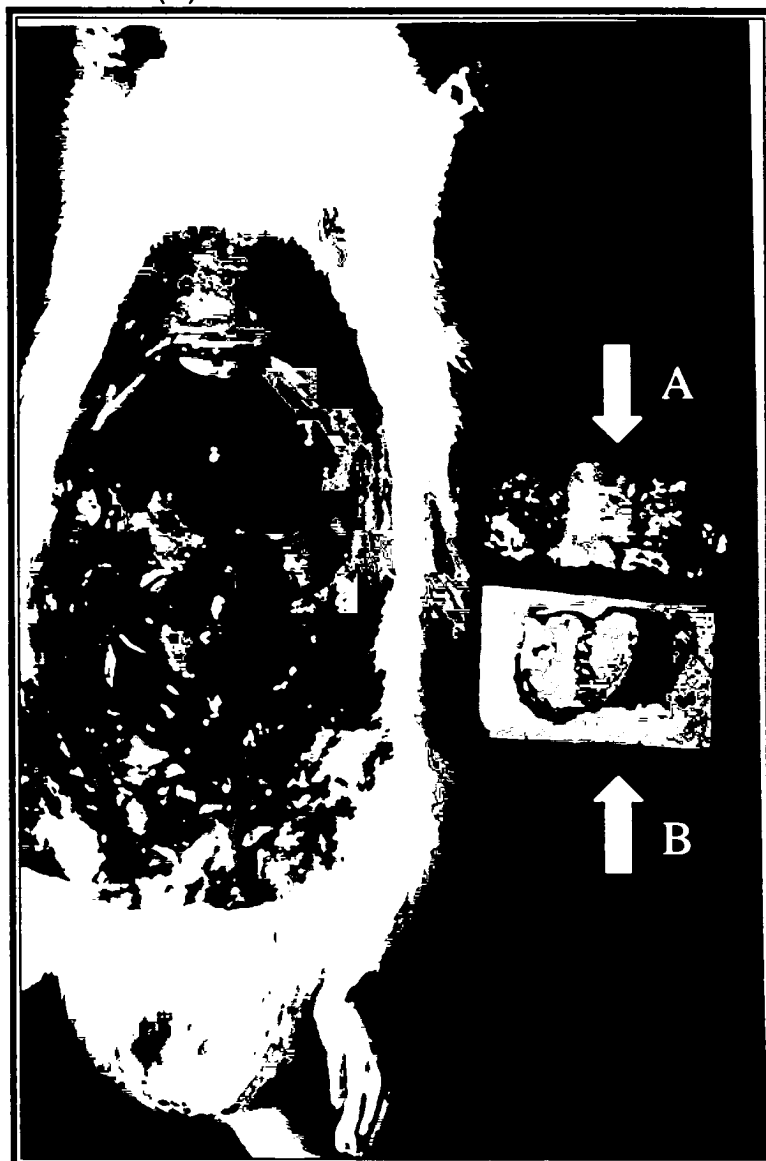
FIGURA 9 – SEQUÊNCIA DE RUPTURA DE UM CORPO DE PROVA



A força de tração foi constantemente medida por meio do computador anexo ao sistema de presilhas. O programa demonstrava um sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representava a unidade Distância e o eixo y a unidade Força. Inicialmente o gráfico apresentou direção ascendente. No momento da ruptura inicial, o gráfico demonstrou mudança imediata de direção correspondendo à Força Máxima suportada pelo corpo de prova, medida em Kilograma-força (Kgf). Durante a fase descendente do gráfico, a ruptura da peça estava em progressão, até o momento da queda de tensão ao nível zero, correspondendo à separação total dos retalhos músculo-aponeuróticos. A última força medida pelo computador no gráfico foi denominada Força de Ruptura, medida em Kilograma-força (Kgf).

O segmento caudal da cicatriz foi fixado em formalina a 10%, para o posterior estudo histológico (figura 10).

FIGURA 10 - PEÇA CRANIAL (A) ENVIADA PARA MÁQUINA DE TRAÇÃO, PEÇA CAUDAL (B) PARA ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO



Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 micra de espessura, os cortes histológicos foram corados pela técnica de imunohistoquímica.

A imunohistoquímica é método diagnóstico que tem como objetivo detectar antígeno tecidual ou celular, mediante da utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular (BLEGGI TORRES, SLUMINSKY, TIRONI, NORONHA, GIRON e TELLES, 1998).

As lâminas foram analisadas de forma comparativa, sem o conhecimento prévio pelo patologista do grupo animal ao qual pertenceu o fragmento histológico. No presente estudo foi utilizado o anticorpo FATOR VIII para pesquisa de vasos sangüíneos.

As secções histológicas foram examinadas em microscópio óptico marca Olympus, modelo B 201, com lentes planas apocromáticas (*Olympus, Tokyo, Japão*). Nos cortes histológicos analisados determinou-se o campo microscópico sobre a linha de sutura em aumento de 200 x, em cinco campos distintos aleatoriamente. As imagens foram captadas por câmara Sony CCD 107 A (*Sony, Tokyo, Japão*), transmitidas a um monitor colorido Trinitron Sony, congeladas e digitalizadas no *software* Image Proplus (*Media Cybernetics, Califórnia, EUA*) através de placas Oculus TCX (*Coreco, St. Laurent, Canadá*). Finalmente foi realizada a análise das imagens mediante contagem dos vasos contidos em cada campo distinto, em computador da linha Pentium, obtendo-se então as médias aritméticas.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Fez-se a análise descritiva dos dados mediante tabelas e gráficos.

Para a comparação dos grupos em cada um dos momentos, na variável tração, para cada uma das variáveis testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Em função da diferente variabilidade dos resultados em cada um dos grupos, para testar-se a hipótese acima, adotou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 5%.

Na variável número de vasos, para cada um dos momentos do estudo (7, 14 ou 28 dias), testou-se a hipótese nula de números de vasos iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de números de vasos diferentes. Para tanto, adotou-se o

teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 5%.

Em todas as análises utilizou-se o *software* Statistica V 5.1(Statsoft, Oklahoma, EUA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Não ocorreram óbitos nos 60 ratos submetidos à laparotomia mediana. Também não foi observado no grupo controle ou no grupo que recebeu nicotina complicações como eventração ou infecção da ferida operatória.

4.1 TRAÇÃO

4.1.1 Avaliação da Força Máxima

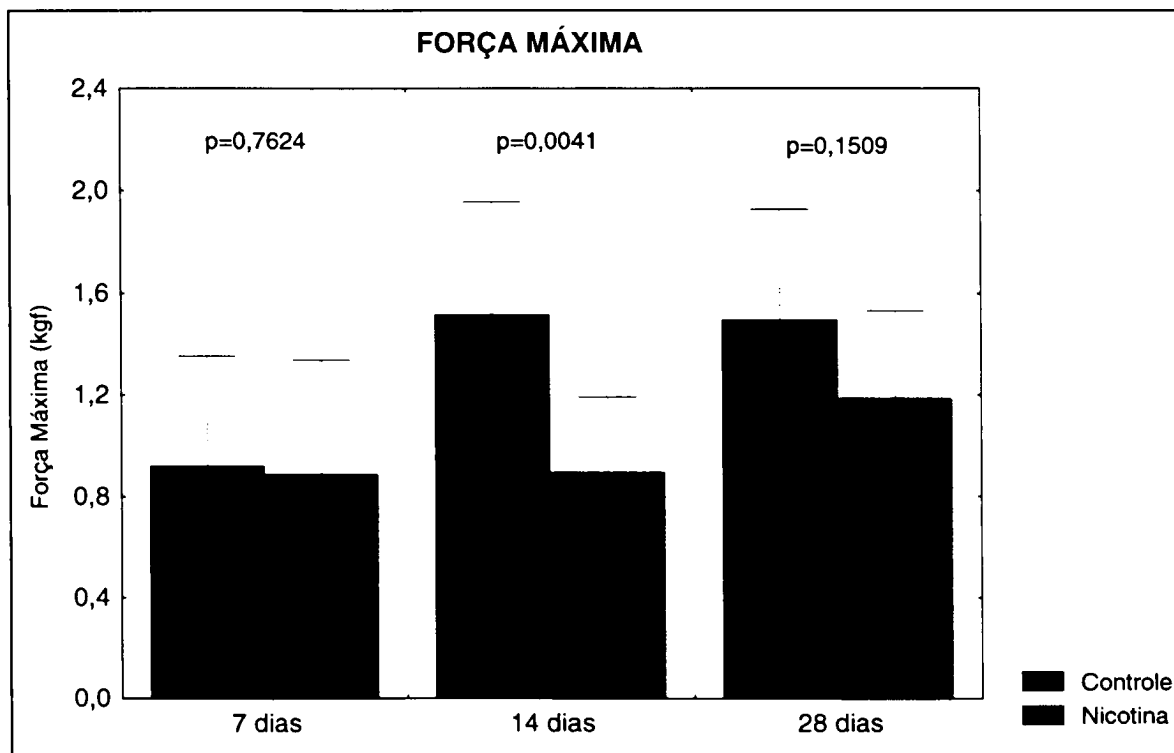
Na variável força máxima, observou-se entre os dois grupos do estudo, diferença significativa no 14 dia pós-operatório, ocorrendo em menor intensidade no grupo Nicotina (tabela 1), como apresentado no gráfico 1.

TABELA 1 – VALORES DA FORÇA MÁXIMA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

Força máxima	Grupo	Média \pm DP	Valor de p
7 dias	Controle	0.919 \pm 0.4374	0,7624
	Nicotina	0.891 \pm 0.4481	
14 dias	Controle	1.517 \pm 0.4390	0,0041
	Nicotina	0.900 \pm 0.2936	
28 dias	Controle	1.495 \pm 0.4318	0,1509
	Nicotina	1.188 \pm 0.3440	

NOTA: O valor de p em negrito indica a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%, para a variável força máxima.
Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

GRÁFICO 1 – VALORES MÉDIOS DA FORÇA MÁXIMA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO



4.1.2 Avaliação da Força de Ruptura

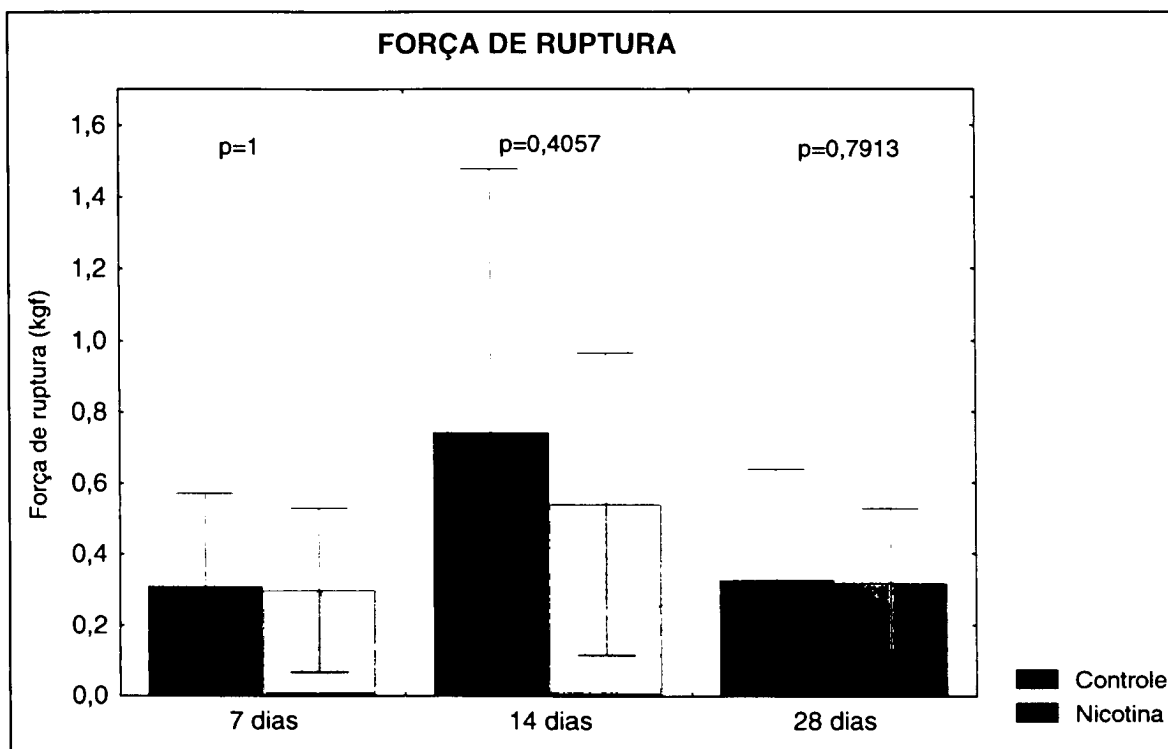
Na variável força de ruptura, não se observou entre os dois grupos do estudo diferença significativa tanto no 7º, 14º e 28º dia do pós-operatório (tabela 2), como apresentado no gráfico 2.

TABELA 2 – VALORES DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

Força de ruptura	Grupo	Média \pm DP	Valor de p
7 dias	Controle	0.307 \pm 0.2647	1,0000
	Nicotina	0.298 \pm 0.2313	
14 dias	Controle	0.741 \pm 0.7366	0,4057
	Nicotina	0.541 \pm 0.4247	
28 dias	Controle	0.323 \pm 0.3151	0,7913
	Nicotina	0.317 \pm 0.2097	

NOTA: Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se o nível de significância de 5%.

GRÁFICO 2 – VALORES MÉDIOS DA FORÇA DE RUPTURA NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO



4.2 NÚMERO DE VASOS

Na variável número de vasos, observou-se entre os dois grupos do estudo, diferença significativa no 7º dia de pós-operatório, ocorrendo em menor número no grupo Nicotina (tabela 3), como visualizado no gráfico 3.

TABELA 3 – NÚMERO DE VASOS

Número de vasos	Grupo	Média	Valor de p
7 dias	Controle	25,94±3,9396	0,0001
	Nicotina	16,84±2,8407	
14 dias	Controle	24,06±3,5616	0,1655
	Nicotina	21,64±4,4240	
28 dias	Controle	21,10±3,4348	0,1431
	Nicotina	19,12±5,8021	

NOTA: O valor de p em negrito indica a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%, para a variável número de vasos. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

GRÁFICO 3 – VALORES MÉDIOS DO NÚMERO DE VASOS NO 7º, 14º E 28º DIA PÓS-OPERATÓRIO

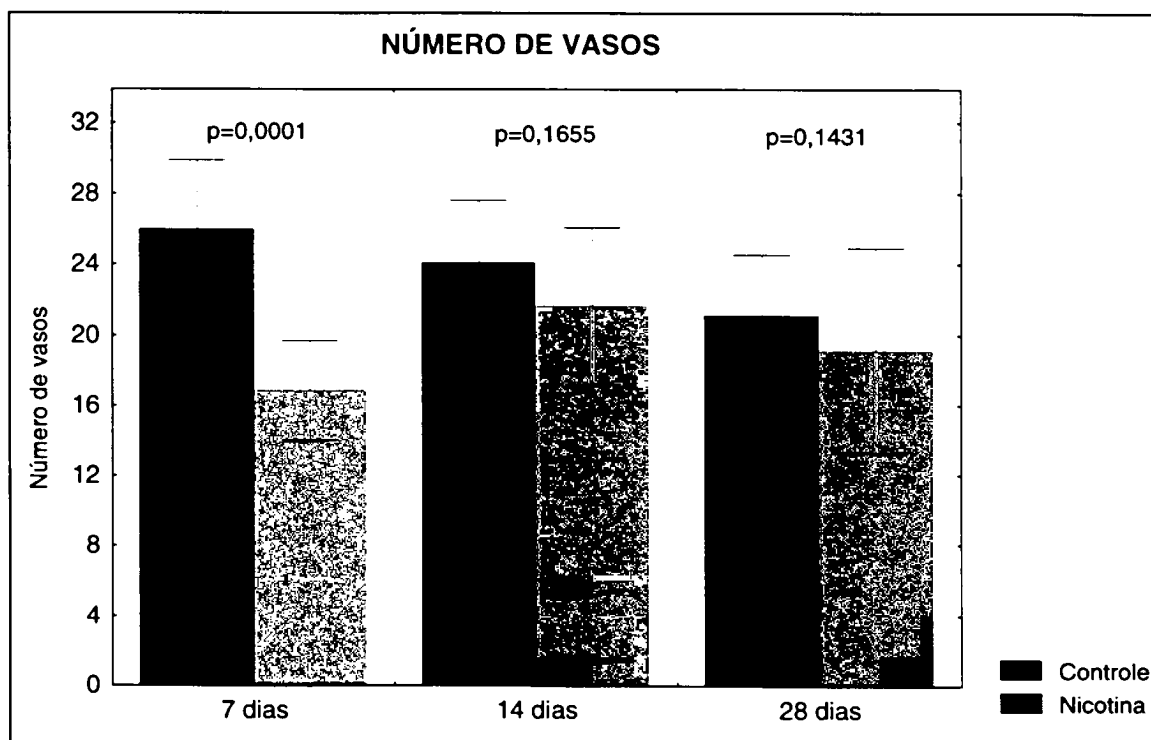


FIGURA 11 – EXEMPLO DE FOTOMICROGRAFIA (200x) CORADA PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA ILUSTRANDO VASOS SANGÜÍNEOS (SETAS)



Nota: Corte histológico representativo da área de cicatrização. (Imunohistoquímica, 200x).

5 DISCUSSÃO

5.1 SOBRE O MÉTODO

A escolha do rato como animal para realização deste experimento deveu-se por ser de pequeno porte, de grande resistência ao meio ambiente, dócil em seu manuseio e produzido em laboratório com linhagens bem definidas, podendo-se obter amostras homogêneas em sua idade e peso de valores. É animal de custo relativamente baixo, que não requer tratamento diferenciado e tem transporte facilitado, podendo-se estudar grande número deles. Não requer alojamento individual e, desta forma, é possível obter número de dados que vai determinar acurácia ao experimento, em um período curto de tempo. Foram utilizados ratos adultos e machos para evitar variações hormonais e possíveis diferenças no processo cicatricial.

LINDSTEDT e SANDBLOM (1975) avaliaram a tensão das cicatrizes em humanos e fizeram uma comparação com a de outros animais. Concluíram que em porcos e coelhos a tensão é maior que a dos humanos, sendo equivalente nos ratos, o que permite que estes sejam utilizados para estudos experimentais e seus resultados transferidos para o uso prático em humanos.

Dentre os trabalhos pesquisados para este estudo, o rato foi o animal utilizado com maior frequência para a pesquisa dos efeitos da nicotina na cicatrização de lesões. Assim, pelo já exposto, acredita-se que o rato seja o animal adequado para este estudo.

A presente pesquisa teve como sítio de estudo a parede abdominal, visto a importância do fechamento deste segmento após laparotomias.

No seu estudo sobre a influência da nicotina na reparação da parede abdominal em ratos, MEDEIROS, CARVALHO, OLIVEIRA MEDEIROS, TEIXEIRA, FARIA, FRANÇA, RAMOS e DANTAS FILHO (1997) utilizaram uma incisão mediana com 5cm de extensão, e fechamento da aponeurose com sutura contínua e fio inabsorvível monofilamentar.

Em revisão de literatura, CARLSON (1997) relata que apesar da incisão mediana não ser anatômica por não seguir as linhas de força, diversos trabalhos não encontraram diferença significativa entre esta e a incisão transversa quanto ao aparecimento de eventrações. A incisão mediana baseou-se nestes estudos.

Para a escolha da técnica de fechamento, contínua ou interrompida, SEID, OWENS, POOLE e MEEKS (1995), avaliando os dois tipos de sutura, afirmaram que a contínua apresenta maior força necessária para a ruptura da aponeurose devido à distribuição homogênea da força ao longo de toda a área suturada. A incisão mediana com sutura contínua foi utilizada neste estudo embasada na literatura.

A retirada dos fios de sutura da peça operatória foi baseada na dissertação de COELHO (1999), que relata que a sutura que não é removida apresenta maior resistência à tensão. Isto foi igualmente justificado por TERA e ABERG (1976), que atribuem o fato ao poder de sustentação dado pela sutura aos tecidos próximos à incisão onde os pontos foram ancorados.

O fio de sutura, dependendo do tipo de material utilizado, pode ter grande interferência no processo de cicatrização do fechamento da parede abdominal. Apesar do progresso, ainda não se conhecem todos os fenômenos biológicos envolvidos na cicatrização. A aplicação de fios de sutura interfere nesses fenômenos, daí a busca incessante de material que produza a menor reatividade biológica. Existem evidências de que os fios monofilamentares inabsorvíveis, tal como o de polipropileno, provocam menor reação tecidual e, portanto, menor interferência no processo cicatricial, todavia ainda não é considerado o material ideal (CHAIB, LING e VASCONCELOS, 1972; VAN WINCLE e HASTINGS, 1972).

No presente estudo, foi utilizado o fio monofilamentar de polipropileno 4-0, por se desejar mínima reação inflamatória tecidual pela própria presença do fio, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização, ocasionando eventuais erros na análise dos resultados.

A administração da nicotina em animais de experimentação pode ser realizada de diversas formas. Em estudos como os de BALFOUR (1980) e LAU, SPEAR e FALK (1994), a via oral foi escolhida; FORREST, PANG e LINDSAY (1991) argumentaram que esta via traz o inconveniente que os ratos podem diminuir drasticamente a ingestão de água contendo nicotina, possivelmente devido ao sabor desagradável. Além disso, foram citados casos de extensa ulceração hemorrágica na mucosa gástrica dos animais.

O uso da nicotina via intraperitoneal foi utilizada na pesquisa de RAO, MORRISON e O'BRIEN (1983), porém pode levar à contaminação da parede abdominal pela ação direta da nicotina na ferida operatória, interferindo na análise adequada dos resultados.

A via endovenosa foi utilizada nos trabalhos de MARKS, STITZEL e COLLINS (1987) e VALENTINE, HOKANSON, MATTA e SHARP (1997); mas, segundo FORREST, PANG e LINDSAY (1991), a utilização da via endovenosa por período prolongado de tempo requer o implante de cateter na veia jugular dos animais, aumentando de maneira importante a dificuldade de manejo e a morbi-mortalidade.

MEDEIROS, CARVALHO, OLIVEIRA MEDEIROS, TEIXEIRA, FARIA, FRANÇA, RAMOS e DANTAS FILHO (1997) utilizaram disco de nicotina de implantação subcutânea em seu estudo. Este apresenta a vantagem da acurácia na determinação do montante de nicotina administrada, porém funciona por pouco tempo e necessita ser trocado periodicamente. Apresenta custo elevado, além de requerer operação e anestesia geral repetidas vezes, para seu reimplante (FORREST, PANG e LINDSAY, 1991).

A via inalatória foi utilizada por HAAG, LARSON e WEATHERBY (1960) e CRAIG e REES (1985), porém segundo FORREST, PANG e LINDSAY (1991), o uso desta via em animais de experimentação os expõe não só à nicotina, mas a todos os subprodutos da fumaça do cigarro, e a frequência da exposição à fumaça e os níveis plasmáticos destes subprodutos não são similares àqueles encontrados em humanos tabagistas. Além disso, podem tornar-se intoxicados quando confinados aos aparatos produtores de fumaça, podendo levá-los à morte.

A via de injeções diárias de nicotina subcutânea foi utilizada por diversos autores (FORREST, PANG e LINDSAY, 1985; FORREST, PANG e LINDSAY, 1987; FORREST, PANG e LINDSAY, 1991; BOZARTH, PUDIAK e KUOLEE, 1998; SKINOVSKY, 2001). Esta via demonstra boa tolerância por parte dos animais, rápida absorção da droga com níveis plasmáticos de pico em torno de cinco minutos, oferecendo meio conveniente para investigação dos efeitos da nicotina em ratos.

ULRICH, HARGREAVES e FLORES (1997), em estudo experimental comparando a injeção subcutânea de nicotina com a liberação da droga por mini-bolsas na tela subcutânea, concluíram que a dosagem diária total é mais importante que os níveis constantes da droga via infusão contínua.

No estudo já referido de FORREST, PANG e LINDSAY (1987), a dose necessária para se encontrar alterações ao nível de cicatrização de retalhos dorsais em ratos com uso de nicotina subcutânea, foi igual ou superior a 2mg por Kg de peso, duas vezes ao dia. Também observaram que a administração da droga deveria ser iniciada 28 dias antes da operação. A dose utilizada no presente trabalho (2mg por kg de peso em 2 tomadas diárias) baseou-se neste experimento. Esta mesma dose foi empregada na dissertação de SKINOVSKY (2001), em estudo de cicatrização de anastomoses de intestino delgado em ratos.

A dose de 2mg por kg de peso ao dia equivaleria, segundo RICHARDSON, MORTON e HOWARD (1977), ao consumo aproximado de três pacotes de cigarro (60 unidades) ao dia.

Em pesquisa já citada, FORREST, PANG e LINDSAY (1991) concluíram que os resultados de cicatrização não diferiram quando o uso da nicotina se deu a longo prazo, ou quando a droga foi empregada em dose maior e tempo de utilização menor. Porém, os autores só obtiveram êxito nos resultados quando a utilização da nicotina não cessou por pelo menos duas semanas antes da cirurgia.

Pelo exposto, utilizou-se no presente estudo a administração da nicotina por 28 dias prévios ao procedimento cirúrgico, tendo a injeção da droga continuado no período pós-operatório até a morte dos animais.

A boa cicatrização de uma ferida com o desenvolvimento de força tênsil adequada está intimamente relacionada com a proliferação fibroblástica e deposição do colágeno e outros elementos do tecido conectivo. A maioria dos dados disponíveis na literatura chega a um consenso que a síntese de colágeno atinge seu nível máximo nos primeiros 7 a 14 dias pós-lesão, ocorrendo o pico de deposição dessa proteína no sítio de cicatrização do 21º ao 28º dias de evolução (PEACOCK, 1962; MADDEN e PEACOCK, 1968; DIEGELMANN, ROTHKOPF e COHEN 1975; ORGILL e DEMLING, 1988).

No 3º dia do processo cicatricial já existem fibroblastos e fibras colágenas, porém estas estão inicialmente orientadas de maneira vertical e não fazem conexão nas margens da incisão. A força tênsil da ferida está relacionada com a multiplicação e maturação dos fibroblastos. Segundo HARVEY (1929), é necessário um período de aproximadamente quatro dias para que haja crescimento e maturação apreciável dos fibroblastos.

No presente experimento, os intervalos de tempo utilizados para acompanhar a formação de neovascularização no processo cicatricial e a influência na força máxima e força de ruptura na parede abdominal foram de 7, 14 e 28 dias após o procedimento operatório.

Um dos aspectos mais importantes da cicatrização é a taxa em que uma ferida ganha resistência à tração. É importante que fiquem esclarecidas as variáveis

analisadas com relação à tração, antes de se discutir os resultados. Segundo OGATA (2002), Força de ruptura reflete o momento final de ruptura da amostra, sendo considerada variável secundária, teoricamente sem importância cirúrgica uma vez que corresponde a um evento terminal da ruptura. Força máxima corresponde ao primeiro momento da ruptura da peça, considerada a variável de maior importância avaliada.

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos por meio de um processo em que são formados brotos capilares em resposta a estímulos químicos externos. Isto ocorre durante a embriogênese, durante o crescimento de tumores sólidos e na cicatrização de feridas (PETTET, CHAPLAIN, McELWAIN, e BYRNE 1996).

O crescimento de novos vasos sanguíneos é um passo crítico na cura da ferida, e pode estar relacionado a fatores locais, mediadores químicos, matriz extracelular, gradientes metabólicos e forças físicas (ARNOLD e WEST 1991; PETTET, BYRNE, MCELWAIN e NORBURY 1996). Por estes motivos esta variável foi utilizada para a avaliação da cicatrização.

Em seu estudo sobre angiogênese na cura de feridas RUITER, SCHLINGEMANN, WESTPHAL, DENIJIN, RIETVELD e De WAAL (1993) usaram como antígeno na técnica de imunohistoquímica o PAL-E, que é altamente específico para endotélio de vaso sanguíneo, porém sua sensibilidade é menor que outros marcadores, como o fator VIII e o CD 34, e não é expressado em arteríolas.

Neste experimento a contagem dos vasos sanguíneos foi realizada pela técnica de imunohistoquímica. O antígeno utilizado foi o fator VIII.

5.2 SOBRE OS RESULTADOS

5.2.1 Análise da Força Máxima e Força de Ruptura

No 7º dia pós-operatório, embora os valores da força máxima e força de ruptura tenham se mostrados menores no grupo Nicotina quando comparados ao grupo Controle, os resultados obtidos com estas variáveis não demonstraram diferença estatisticamente significativa nos valores médios obtidos entre os dois grupos estudados.

O 7º dia pós-injúria é um período em que a proliferação fibroblástica já se demonstra de maneira intensa na cicatrização normal (HARVEY, 1929; ORGILL e DEMLING, 1988). A ação inibidora da nicotina, nesse período, não demonstrou significância estatística neste trabalho, pois sua ação deletéria poderia levar à deficiência na deposição de colágeno e/ou à diminuição da revascularização, levando à diminuição da força mecânica da parede abdominal, o que ocorreu de maneira discreta.

No 14º dia de evolução, notou-se diminuição estatisticamente significativa na força máxima ($p= 0,0041$), o que não ocorreu com a força de ruptura ($p= 0,4057$), quando se compararam os valores médios do grupo Nicotina ao grupo Controle.

Durante a fase inicial do processo de cicatrização, existe estreita relação entre o aumento da força mecânica do tecido e a biogênese do colágeno, segundo PEACOCK (1962). Este autor ainda sugeriu que o ganho da força mecânica em cicatrizes, nas fases tardias da cicatrização, deve-se principalmente à reorganização e interligação das moléculas de colágeno e não ao aumento específico da síntese dessa proteína.

A taxa de deposição de colágeno, no tecido cicatricial, atinge seu pico máximo em torno do 14º dia pós-lesão, conforme MADDEN e PEACOCK (1968), diminuindo progressivamente após esse tempo.

Segundo CHAMSON, FREY e HIVERT (1982), a nicotina afeta a síntese do colágeno e, principalmente, a sua produção com decréscimo do tipo III desta proteína.

ADAMSONS, MUSCO e ENQUIST (1964) concluíram que a força mecânica dos tecidos cicatriciais aumenta durante os primeiros nove dias de evolução da lesão. Após este período, esta se torna mais gradual e linear, até alcançar valores iguais aos dos tecidos controle normais ao redor do 28º dia. Os autores relataram que a concentração absoluta de colágeno no tecido cicatricial não interfere com a força mecânica do tecido em cicatrização, entrando em concordância com o trabalho relatado por PEACOCK (1962).

No presente estudo, a diminuição da força máxima que ocorreu neste período pode ter sido possivelmente devido ao efeito deletério ocasionado pela nicotina, onde a agregação plaquetária, diminuição da angiogênese e, conseqüentemente, diminuição do fluxo sanguíneo capilar com menor aporte de oxigênio tecidual (REUS, ROBSON, ZACHARY e HEGGERS 1984; SHERWIN e GASTWIRTH 1990) influenciaram na formação do colágeno e nos resultados obtidos.

MEDEIROS, LIMA, DANTAS FILHO, MELO e AZEVEDO (2003) concluíram em sua pesquisa que a nicotina exerce efeito deletério sobre a cicatrização de lesões da parede abdominal. A diminuição da resistência à tensão ocorreu no 10º dia pós-operatório, juntamente com decréscimo da PO₂ do líquido tecidual próximo à área da lesão, à semelhança dos achados deste estudo.

No 28º dia após a operação, não foram observadas diminuições estatisticamente significativas nos valores médios das variáveis no grupo de animais que receberam nicotina. Embora, na amostra estudada, os ratos que sofreram a ação da nicotina apresentassem menor resistência tecidual na área da parede abdominal quando submetidos à tração de suas extremidades, o valor de p para força máxima e força de ruptura não foi significativo, talvez devido ao pequeno número da amostra.

ORGILL e DEMLING (1988) relataram que o pico de deposição do colágeno se dá entre 21 e 28 dias após a injúria tecidual.

Como já citado anteriormente, a cicatrização não depende apenas da quantidade de fibras colágenas, e sim da reorganização e interligação das moléculas desta proteína.

5.2.2 Análise do Número de Vasos

Na avaliação do 7º dia após a cirurgia, a análise da variável número de vasos, caracterizada pela angiogênese na ferida operatória, mostrou-se mais intensa nas amostras do grupo C, obtendo-se diferença significativa entre os grupos com relação ao teste realizado.

Um ferimento é seguido imediatamente por coagulação, alteração da vascularização e inflamação, ocorrendo de imediato aumento da permeabilidade capilar e início de formação de novos brotos sangüíneos (CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984).

Para SHERWIN e GASTWIRTH (1990), existe relação importante entre o fluxo sangüíneo da microcirculação, a taxa de oxigênio e a cicatrização da ferida. O uso da nicotina sugere, de forma experimental, que ela cria estado de anóxia cutânea principalmente de extremidades.

A angiogênese parece estar relacionada com a liberação de fatores de crescimento secretados por diversas células, que participam ativamente do intrínseco mecanismo da cicatrização. A fibroplasia e a síntese do colágeno iniciam-se nas primeiras 24 horas do ferimento, seguindo-se em 48 a 72 horas pela migração endotelial. Em torno do quarto dia, os macrófagos produzem fatores de crescimento que estimulam, além da proliferação fibroblástica, a neovascularização (KNIGHTON, HUNT, THAKRAL e GOODSON, 1982; ORGILL e DEMLING, 1988).

MELKONIAN, CHEUNG, MARR, TONG e TALBOT (2002), utilizando a membrana cório alantóide de aves, sob a ação da nicotina do cigarro, notaram diminuição no crescimento, desenvolvimento e migração de vasos sangüíneos, além de alterações na proliferação celular, no 6º dia de avaliação das amostras, corroborando com os achados desta pesquisa.

Em pesquisa realizada por MEDEIROS, LIMA, DANTAS FILHO, MELO e AZEVEDO (2003), a nicotina por via subcutânea exerceu efeito deletério sobre a cicatrização de lesões da parede abdominal em ratos no 10º dia após a cirurgia. A ação inibidora da nicotina, nesse período, demonstrada pela significância estatística encontrada neste trabalho, pode ter sido decorrente da diminuição da PO₂ tecidual, uma vez que este parâmetro é de suma importância para todos os fenômenos do processo de cicatrização.

A diminuição do fluxo sangüíneo demonstrada pela ação da nicotina parece afetar todo o processo de cicatrização. A sua ação vasoconstritora impede a chegada conveniente de nutrientes e oxigenação celular adequada, com prejuízo na proliferação celular para o sítio da injúria e diminuição dos fatores de crescimento produzidos por estas células. Conseqüentemente, verifica-se menor neovascularização.

Em trabalhos recentes na literatura, o estudo da angiogênese em relação à nicotina parece tomar um rumo diferente ao que vinha se propondo até o momento.

O primeiro autor a descrever que a nicotina teria função de estimular a angiogênese foi VILLABLANCA (1998), em estudo *in vitro*. Seguiram-se os trabalhos de HEESCHEN, JANG, WEIS, PATHAK, KAJI, HU, TSAO, JOHNSON e COOKE (2001), que demonstraram evidências anatômicas e funcionais de que a nicotina induz angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, em outro estudo, os autores JACOBI, JANG, SUNDRAM, DAYIUB, FAJARDO e COOKE (2002) propuseram uma via colinérgica endógena mediada por receptores acetilcolinérgicos endoteliais nicotínicos como responsáveis pelo aumento da taxa de angiogênese.

No presente estudo, a nicotina não mostrou possuir efeito estimulador sobre a formação de novos vasos sangüíneos no sítio da lesão, de maneira contrária aos estudos de JACOBI, JANG, SUNDRAM, DAYIUB, FAJARDO e COOKE (2002); HEESCHEN, WEIS, COOKE (2003).

Na avaliação do 14º dia após a cirurgia, os resultados obtidos com o estudo da angiogênese demonstraram que o número de vasos do grupo Nicotina foi inferior ao do grupo Controle, embora não tenha apresentado redução estatisticamente significativa.

A nicotina exerce diversos efeitos específicos que podem influenciar a cicatrização das feridas. Primeiro, a proliferação de células sanguíneas, fibroblastos e macrófagos é diminuída; segundo, a nicotina está associada ao aumento da adesividade plaquetária, causando microtrombos e diminuição da microperfusão; terceiro, enquanto os tecidos necessitam de oxigênio e fluxo sangüíneo, a nicotina produz vasoconstrição cutânea (SILVERSTEIN, 1992).

Diversos trabalhos demonstram correlação entre fibroblastos, macrófagos e angiogênese. O crescimento de novos brotos sangüíneos ocorre paralelamente ao fluxo de fibroblastos para dentro da ferida e formação de nova matriz extracelular. Os macrófagos são as células-chave na regulação da angiogênese, controlando e induzindo a produção de fatores de crescimento celular. A depleção dos macrófagos reduz a taxa de angiogênese e fibroplasia durante a cicatrização das feridas (SHERRATT e DALLON, 2002; ARNOLD e WEST, 1991; TONNESEN, FENG e CLARK, 2000; LINGEN, 2001).

No 28º dia pós-operatório a análise da variável número de vasos não mostrou diferença estatisticamente significativa nas amostras entre os dois grupos. O número de vasos do grupo Nicotina foi pouco inferior ao do grupo Controle, em números absolutos, porém sem significância estatística. Isto pode ser explicado por que neste período já existe cicatriz rica em colágeno, com a maioria dos novos vasos sangüíneos em processo de degeneração (TONNESEN, FENG e CLARK, 2000).

Essa redução do número de vasos tem sido reportada por estudos *in vivo* com auxílio do microscópio eletrônico (ARNOLD e WEST, 1991).

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste experimento, observou-se que a utilização de nicotina, na metodologia determinada, levou à diminuição estatisticamente significativa da força máxima do tecido cicatricial no 14º dia após a realização do fechamento da parede abdominal, bem como à menor angiogênese no 7º dia após a cirurgia.

As alterações observadas na variável força máxima no 14º dia podem ser especuladas como sendo decorrência da diminuição da síntese do colágeno. Esta proteína é a principal responsável pela força mecânica do tecido cicatricial (MADDEN e PEACOCK, 1968; CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984; WITTE e BARBUL, 1997).

Sabe-se que a nicotina diminui o fluxo sangüíneo capilar pela liberação de aminas vasoativas, com redução da concentração de oxigênio tecidual (WATTS, 1960). Conseqüentemente a hidroxilação ribossômica da prolina e lisina é prejudicada, interferindo negativamente na síntese da nova cadeia de colágeno (CARRICO, MEHRHOF e COHEN, 1984).

Com relação à diminuição do número de vasos, que ocorreu no 7º dia pós-operatório desta pesquisa, pode-se acreditar que foram devido às várias ações deletérias que a nicotina pode ocasionar, como já descritas anteriormente.

Pelo exposto, pouco se sabe sobre os verdadeiros mecanismos pelo qual a nicotina atua no processo cicatricial. São necessárias mais avaliações experimentais e clínicas que possam esclarecer o real papel da nicotina na cicatrização das feridas. Novas pesquisas devem ser realizadas para que no futuro o ato de fumar seja cada vez mais desencorajado baseando-se em dados científicos.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite concluir que a nicotina, na dose de 2mg/kg de peso do animal, em duas administrações diárias, associa-se à piora da cicatrização da parede abdominal em ratos, segundo os seguintes parâmetros:

1. redução da força máxima no 14º dia após o fechamento da parede abdominal;
2. não altera a força de ruptura após o fechamento da parede abdominal;
3. redução do número de vasos sanguíneos no 7º dia após o fechamento da parede abdominal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMSONS, R.J.; MUSCO, F.; ENQUIST, I.F. The relationship of collagen content to wound strength in normal and scorbutic animals. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.119, n.1, p.323-329, 1964.
- AMARAL, M. **Dicionário Histórico, Biográfico, Bibliográfico, Numismático e Artístico**, v.VII, p.5-6, 2000-2001.
- ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, v.52, n.3, p.407-422, 1991 .
- ARREDONDO, J.; HALL, L.L.; NDOYE, A.; NGUYEN, V.T.; CHERNYAVSKY, A.L.; BERCOVICH, D.; ORR-URTREGER, A.; BEAUDET, A.L.; GRANDO, S.A. Central role of fibroblast $\alpha 3$ nicotinic acetylcholine receptor in mediating cutaneous effects of nicotine. **Lab. Invest.**, v.83, n.2, p.207-225, 2003.
- BALFOUR, D.J.F. Studies on the biochemical and behavioral effects of oral nicotine. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, Paris, v.245, n.1, p.95-103, 1980.
- BENOWITZ, N. Clinical pharmacology of nicotine. **Ann. Rev. Med.**, Palo Alto, v.37, p.21-33, 1986.
- BLEGGI TORRES, L.F.; SLUMINSKY, B.G.; TIRONI, F.A.; NORONHA, L.; GIRON, R.L.; TELLES, J.E.Q. Contribuição da Imunohistoquímica em Patologia Cirúrgica: Experiência de 10 anos. **Rev. Méd. Paraná.**, Curitiba, v.56, n.2/2, p.31-38, 1998.
- BOZARTH, M.A.; PUDIAK, C.M.; KUOLEE, R. Effect of chronic nicotine on brain stimulation reward. Effect of daily injections. **Behav. Brain. Res.**, Amsterdam, v.96, n.1-2, p.185-188, 1998.
- CARLSON, M.A. Wound acute failure. **Surg. Clin. N. Am.**, v.3, p.603-631, 1997.
- CARRICO, T.J.; MEHRHOF, A.I.; COHEN, I.K. Biology of wound healing. **Surg. Clin. N. Am.**, v.64, p.721-733, 1984.
- CHAIB, S.A.; LING, W.S.; VASCONCELOS, E. Avaliação experimental dos fios de sutura em um só plano. **Rev. Paul. Med.**, São Paulo, v. 80, n.5-6, p.217-226, 1972.
- CHAMSON, A.; FREY, J.; HIVERT, M. Effects of tobacco smoke extracts on collagen biosynthesis by fibroblast cell culture. **J. Toxicol. Environ. Health.**, Washington DC, v.9, n.5-6, p.921-932, 1982.

CHAMSON, A.; GARRONE, R.; AUGER, C.; FREY, J. Effects of tobacco smoke extracts on the ultrastructure of fibroblasts in culture. **J. Submicrosc. Cytol.**, Bologna, v.12, n.3, p.401-406, 1980.

COELHO, I.C.M.M. **Estudo comparativo da tensão entre as cicatrizes das laparotomias paramedianas e das laparotomias transversas em ratos jovens.** Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

COSTA e SILVA, V. L. Tabagismo, um problema de saúde pública no Brasil. **J. B. M.**, Rio de Janeiro, v.59, n.2, p.14-24, 1990.

CRAIG, S.; REES, T.D. The effects of smoking on experimental skin flaps in hamsters. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.75, n.6, p.842-846, 1985.

CRONIN, K.; JACKSON, D.S.; DUNPHY, J.E. Specific activity of hydroxyproline-tritium in the healing colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.126, n.5, p.1061-1065, 1968.

DAFTARI, T.K.; WHITESIDES, T.E.; HELLER, J.G.; GOODRICH, A.C.; McCAREY, B.E.; HUTTON, W.C. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. **Spine**, v.19, n.8, p.904-911, 1994.

DIEGELMANN, R.F.; ROTHKOPF, L.C.; COHEN, I.K. Measurement of collagen biosynthesis during wound healing. **J. Surg. Res.**, Virginia, v.19, n.4, p.239-243, 1975.

FLETCHER, H.G. The history of nicotine. **J. Chem. Educ.**, Beijing, v.18, p.303-308, 1941.

FORREST, C.R.; PANG, C.Y.; LINDSAY, W.K. Detrimental effect of nicotine on skin flap viability and blood flow in random skin flap operation on rats and pigs. **Surg. Forum**, Chicago, v.36, p.611-613, 1985.

_____. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random-pattern skin flaps in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v.40, n.3, p.295-299, 1987.

_____. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.87, n.3, p.518-528, 1991.

FRICK, W.G.; SEALS, R.R. Smoking and wound healing: a review. **Tex. Dent. J.**, Austin, v.111, n.6, p.21-23, 1994.

GADELHA, M.I.P. Tabagismo e câncer. **J. B. M.**, Rio de Janeiro, v.59, n.3, p.24-38, 1990.

GIANNOPOULOU, C.; GEINOZ, A.; CIMASONI, G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.26, n.1, p.49-55, 1999.

HAAG, H.B.; LARSON, P.S.; WEATHERBY, J.H. The effect on rats of chronic exposure to cigarette smoke. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.90, p.227-238, 1960.

HARVEY, S.C. The velocity of the growth of fibroblasts in the healing wound. **Arch. Surg.**, Chicago, v.18, n.4, p.1227-1240, 1929.

HEESCHEN, C.; WEIS, M.; COOKE, J.P. Nicotine promotes arteriogenesis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.41, n.3, p.489-496, 2003.

HEESCHEN, C.; JANG, J.J.; WEIS, M.; PATHAK, A.; KAJI, S.; HU, R.S.; TSAO, P.S.; JOHNSON, F.L.; COOKE, J.P. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. **Nat. Med.**, v.7, n.7, p.833-839, 2001.

HIJJAR, M.A.; COSTA e SILVA, V.L. Epidemiologia do tabagismo no Brasil. **J. B. M.**, Rio de Janeiro, v.60, n.1, p.50-71, 1991.

HOLLINGER, J.O.; SCHMITT, J.M.; HWANG, K.; SOLEYMANI, P.; BUCK, D. Impact of nicotine on bone healing. **J. Biomed. Mater. Res.**, Oregon, v.45, n.4, p.294-301, 1999.

JACOBI, J.; JANG, J.J.; SUNDRAM, U.; DAYOUB, H.; FAJARDO, L.F.; COOKE, J.P. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. **Am. J. Pathol.**, v.161, n.1, p.97-104, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Tecido conjuntivo. In:_____. **Histologia básica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995. p. 69-84.

KIVIRIKKO, K.I.; RISTELI, L. Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological states. **Med. Biol.**, Springfield, v.54, n.3, p.159-189, 1976.

KNIGHTON, D.R.; HUNT, T.K.; THAKRAL, K.K.;GOODSON, W.H. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. **Ann.Surg.**, v.196, n.4,p.379-388, 1982.

KNOLMAYER, T.J.; CORNELL, K.M.; BOWYER, M.W.; McCULLOUGH, J.S.; KOENIG, W. Imbrication versus excision for fascial healing. **Am. J. Surg.**, v.172, n.5, p.506-511, 1996.

LAU, C. E.; SPEAR, D. J.; FALK, J. L. Acute and chronic nicotine effects on multiple-schedule behavior: oral and sc routes. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v.48, n.1, p.209-215, 1994.

LAWRENCE, W.T.; MURPHY, R.C.; ROBSON, M.C.; HEGGERS, J.P. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v.37, n.2, p.216-219, 1984.

LEIBOVICH, S.J.; ROSS, R.A. macrophage dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblasts in vitro. **Am. J. Pathol.**, v.84 , p.501, 1976.

LIND, J.; KRAMHOFT, M.; BODTKER, S. The influence of smoking on complications after primary amputations of the lower extremity. **Clin. Orthop.**, v.267, p.211-217, 1991.

LINDSTEDT, E.; SANDBLOM, P. Wound healing in man: Tensile strength of healing wounds in some patient groups . **Ann. Surg.**, v.181, n.6, p.842-846, 1975.

LINGEN, M.W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.125, n.1, p.67-71, 2001.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, St. Louis, v.64, n.1, p.288-294, 1968.

MARKS, M.I.; STITZEL, J.A.; COLLINS, A.C. Influence of kinetics of nicotine administration on tolerance development and receptor levels. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v.27, n.3, p.505-512, 1987.

MEDEIROS, A.C.; CARVALHO, M.G.F.; OLIVEIRA MEDEIROS, M.H.; TEIXEIRA, I.C.D.; FARIA, E.D.B.; FRANÇA, M.L.F.; RAMOS, C.C.O.; DANTAS FILHO, A.M. A nicotina como fator deletério na reparação da parede abdominal. Estudo em ratos. **Rev. Ass. Med. RN.**, v.3 , p.25-28, 1997.

MEDEIROS, A.C.; LIMA, F.P.; DANTAS FILHO, A.M.; MELO, N.M.C.; AZEVEDO, I.M. A nicotina atua como fator deletério na reparação da parede abdominal. **Acta Cir. Bras.** v.18, n.1, p.19-23, 2003.

MELKONIAN, G.; CHEUNG, L.; MARR, R.; TONG, C.; TALBOT, P. Mainstream and sidestream cigarette smoke inhibit growth and angiogenesis in the day 5 chick chorioallantoic membrane. **Toxicol. Sci.**, v.68, n.1, p.237-248, 2002.

MOLLER, A.M.; VILLEBRO, N.; PEDERSEN, T.; TONNESEN, H. Effect of preoperative smoking intervention on postoperative complications: a randomized clinical trial. **Lancet**, v.359, n.9301, p.114-117, 2002

MOSELY, L.H.; FINSETH, F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. **Hand.**, v.9, n.2, p.97-101, 1977.

MOSELY, L.H.; FINSETH, F.; GOODY, M. Nicotine and its effect on wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.61, n.4, p.570-575, 1978.

MYERS, A.H.; POSTLETHWAIT, R.W.; SMITH, A.G. Histologic grading of the experimental healing wound. **Arch. Surg.**, Chicago, v.83, n.1, p.147-150, 1961.

NADLER, J.L.; VELASCO, J.S.; HORTON, R. Cigarette smoking inhibits prostacyclin formation. **Lancet**, London, v.1, p.1248-1250, 1983.

NASH, W.A. Tração e compressão. In: _____. **Resistência dos Materiais**. São Paulo : Ed. Mc Grant Hill do Brasil, 1972. p.11-20.

NEHER, G.H. Nicotine induced depression of lymphocyte growth. **Toxic. Appl. Pharmacol.**, New York, v.27, n.2, p.253-258, 1974.

NEILSON, E.G.; PHILIPS, S.M.; JIMENEZ, S. Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. **J. Immunol.**, Baltimore, v.128, n.3, p.1484-1486, 1982.

NOLAN, J.; JENKINS, R.A.; KURIHARA, K.; SCHULTZ, R.C. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.75, n.4, p.544-549, 1985.

NOMINA Anatômica veterinária. Barcelona: Aedos, 1975. 218 p.

OGATA, A.C. **Prótese externa de politetrafluoroetileno como reforço de anastomose traqueal em coelhos – Avaliação da resistência à tensão**. Curitiba, 2002 Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v.16, n.9, p.899-907, 1988.

PEACOCK, E.E. Some aspects of fibrinogenesis during the healing of primary and secondary wounds. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.115, n.4, p.408-414, 1962.

PETTET, G.J.; BYRNE, H.M.; McELWAIN, D.L.; NORBURY, J.A model of wound-healing angiogenesis in soft tissue . **Math. Biosci.**, v.136, n.1 , p.35-63, 1996.

PETTET, G.; CHAPLAIN, M.A.; McELWAIN, D.L.; BYRNE, H.M. On the role of angiogenesis in wound healing. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.263, n.1376, p.1487-1493, 1996.

PINTO, J.R. ; BOSCO, A.F. ; OKAMOTO, T. ; GUERRA, J.B. ; PIZA, I.G. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. **Braz. Dent. J.**, v.13 , n.1 , p 3-9 , 2002.

POOLE, G.V. Mechanical factors in abdominal wound closure. The prevention of fascial dehiscence. **Surgery**, v.97, p.631-639, 1985.

PROCKOP, D.J.; KIVIRIKKO, K.I.; TUDERMAN, L.; GUZMAN, N.A. The biosynthesis of collagen and its disorders. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.301, n.1, p.313-323, 1979.

RAO, V.K.; MORRISON, W.A.; O'BRIEN, B. Effect of nicotine on blood flow and patency of experimental microvascular anastomoses. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, v.11, n.3, p.206-209, 1983.

REES, T.D.; LIVERETT, D.M.; GUY, C.L. The effect of cigarette smoking on skin flap survival in the face lift patient. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.73, n.6, p.911-915, 1984.

RENAUD, S.; BLACHE, D.; DUMONT, E.; THEVENON, C.; WISSENDANGER, T. Platelet function after cigarette smoking in relation to nicotine and carbon monoxide. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v.36, n.3, p.389-395, 1984.

REUS, W.F. ; ROBSON, M.C.; ZACHARY, L.; HEGGERS, J. P. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br. J. Plast. Surg.**, v.37, n.2 , p.213-215, 1984.

REUS, W. F.; COLEN, L.B. ; STRAKER, D.J. Tobacco smoking and complications in elective microsurgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.89 , p.490- 494, 1992.

RICHARDSON, D.; MORTON, R.; HOWARD, J. Effects of chronic nicotine administration on RBC velocity in mesenteric capillaries of the rat. **Blood Vessels**, Basel, v.14, n.5, p.318-324, 1977.

RIEBEL, G.D.; BODEN, S.D.; WHITESIDES, T.E.; HUTTON, W.C. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. **SPINE**, v.20, n.20 , p.2198-2202, 1995

RUITER, D.J.; SCHLINGEMANN, R.O.; WESTPHAL, J.R.; DENIJN, M.; RIETVELD, F.J.; DE WAAL, R.M. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. **Behring Inst. Mitt.**, v.92, p.258-272, 1993.

SARIN, C.L.; AUSTIN J.C.; NICKEL, W.O. Effects of smoking on digital blood-flow velocity. **JAMA**, v.229 , n.10 , p.1327-1328, 1974.

SEID, M.H.; OWENS, M.M.; POOLE, G.V.; MEEKS, G.M. A randomized trial of abdominal incision suture technique and wound strength in rats. **Arch. Surg.**, v.130, p.394-397, 1995.

SHERRATT, J.A.; DALLON, J.C. Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. **C. R. Biol.**, v.325, n.5, p.557-564, 2002.

SHERWIN, M.A.; GASTWIRTH, C.M. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. **J. Foot Surg.**, Baltimore, v.29, n.1, p.84-87, 1990.

SHIN, V.Y.; LIU, E.S.; KOO, M.W.; LUO, J.C.; SO, W.H.; CHO, C.H. Nicotine suppresses gastric wound repair via the inhibition of polyamine and K(+) channel expression. **Eur. J. Pharmacol.**, v.444, n.1-2, p.115-121, 2002.

SIANA, J.E.; REX, S.; GOTTRUP, F. The effect of cigarette smoking on wound healing. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 23, n.3, p.207-209, 1989.

SKINOVSKY, J. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses no intestino delgado em ratos.** Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. **Am. J. Med.**, v.93, p.22S-24S, 1992.

SORENSEN, L.T.; KARLSMARK, T.; GOTTRUP, F. Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial. **Ann. Surg.**, v.238, n.1, p.1-5, 2003.

TERA, H.; ABERG, C. Tissue strength of structures involved in musculo-aponeurotic layer sutures in laparotomy incisions. **Acta Chir. Scand.**, v.142, p.349-355, 1976.

TIPTON, D.A.; DABBOUS, M.K. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v.66, p.1056-1064, 1995.

TONNESEN, M.G.; FENG, X.; CLARK, R.A.F. Angiogenesis in wound healing. **J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.**, v.5, n.1, p.40-46, 2000.

UDENFRIEND, S. Formation of hydroxyproline in collagen. **Science**, Washington, v.152, n.3727, p.1335-1340, 1966.

ULRICH, Y.M.; HARGREAVES, K.M.; FLORES, C.M. A comparison of multiple injections versus continuous infusion of nicotine for producing up-regulation of neuronal [3H]-Epibatidine binding sites. **Neuropharmacology**, Oxford, v.36, n.8, p.1119-1125, 1997.

VALENTINE, J.D.; HOKANSON, J.S.; MATTA, S.G.; SHARP, B.M. Self-administration in rats allowed access to nicotine. **Psychopharmacology**, Berlin, v.133, n.3, p.300-304, 1997.

VAN WINCLE, W.; HASTINGS, J. C. Considerations in the choice of suture material for various tissues. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.135, n.2, p.113-126, 1972.

VILLABLANCA, A.C. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro. **J. Appl. Physiol.**, v.84, n.6, p.2089-2098, 1998.

WAHL, S.M.; WAHL, L.M.; MC CARTHY, J.B. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production. **J. Immunol.**, Baltimore, v.121, n.3, p.247-254, 1978.

WATTS, D.T. The effect of nicotine and tobacco smoke on the secretion of epinephrine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.90, p.74-80, 1960.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.77, n.3, p.509-528, 1997.

ZEVIN, S.; GOURLAY, S.G.; BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of nicotine. **Clin. Dermatol.**, v.16, n.5, p.557-564, 1998.

ANEXO

	GRUPO	DIA	RATO	FR	FM	MNV
1	N	7	1	0,722	0,875	16
2	N	7	2	0,147	0,415	14
3	N	7	3	0,054	0,617	17,4
4	N	7	4	0,069	0,613	17
5	N	7	5	0,344	1,248	24
6	N	7	6	0,024	0,822	17,6
7	N	7	7	0,703	1,948	16
8	N	7	8	0,396	0,404	13,6
9	N	7	9	0,121	0,638	16,6
10	N	7	10	0,48	0,932	16,2
11	C	7	1	0,06	0,6	29,2
12	C	7	2	0,486	1,058	28,4
13	C	7	3	0,195	0,445	23,6
14	C	7	4	0,029	0,545	21,6
15	C	7	5	0,411	0,85	25,8
16	C	7	6	0,632	1,683	26,4
17	C	7	7	0,042	1,307	28,8
18	C	7	8	0,207	0,703	20,4
19	C	7	9	0,627	1,377	32,8
20	C	7	10	0,293	0,341	22,4
21	N	14	1	0,279	0,932	19,8
22	N	14	2	0,635	1,641	31,2
23	N	14	3	0,058	1,406	17,2
24	N	14	4	0,478	1,272	20,2
25	N	14	5	0,678	1,583	25,6
26	N	14	6	0,5	1,718	24,8
27	N	14	7	0,079	0,974	19,8
28	N	14	8	0,628	1,324	16,8
29	N	14	9	1,943	2,388	19
30	N	14	10	1,688	1,928	22
31	C	14	1	0,274	0,761	29,2
32	C	14	2	0,472	1,088	28,4
33	C	14	3	0,341	0,495	23,6
34	C	14	4	0,167	0,988	21,6
35	C	14	5	0,94	1,06	25,8
36	C	14	6	0,295	0,765	26,4
37	C	14	7	0,205	0,775	28,8
38	C	14	8	0,488	0,971	20,4
39	C	14	9	1,328	1,515	32,8
40	C	14	10	0,437	0,577	22,4
41	N	28	1	0,011	1,06	12,8
42	N	28	2	0,765	1,965	16
43	N	28	3	0,067	0,922	30,8
44	N	28	4	0,737	1,873	27,8
45	N	28	5	0,056	1,741	19
46	N	28	6	0,289	1,144	15
47	N	28	7	0,129	1,348	15,4
48	N	28	8	0,378	1,093	17,2
49	N	28	9	0,055	2,126	20,4

50	N	28	10	0,746	1,673	16,8
51	C	28	1	0,143	1,642	25
52	C	28	2	0,522	1,155	16,6
53	C	28	3	0,417	1,139	20,2
54	C	28	4	0,167	0,49	18,8
55	C	28	5	0,011	1,49	22
56	C	28	6	0,472	1,288	19,2
57	C	28	7	0,509	1,274	23
58	C	28	8	0,403	0,843	28
59	C	28	9	0,015	1,032	19,8
60	C	28	10	0,512	1,529	18,4

FR - Força de ruptura

FM - Força máxima

MNV - média do número de vasos